

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :

C12Q 1/68, C07H 19/10, 19/20

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 94/23064

(43) Date de publication internationale: 13 octobre 1994 (13.10.94)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00345

(22) Date de dépôt international: 28 mars 1994 (28.03.94)

(30) Données relatives à la priorité:

93/03538

26 mars 1993 (26.03.93)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr. Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CANARD, Bruno [FR/FR]; Villa la Colline, Avenue du Professeur-Chrétien, F-06300 Nice (FR). SARFATI, Simon [FR/FR]; 142, rue de la Roquette, F-75011 Paris (FR).

(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

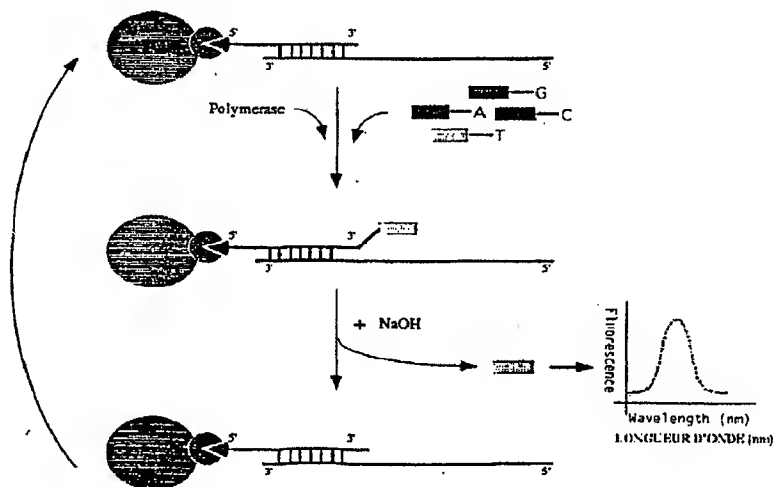
(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NOVEL DERIVATIVES FOR USE IN NUCLEIC ACID SEQUENCING

(54) Titre: NOUVEAUX DERIVES UTILISABLES EN SEQUENÇAGE D'ACIDES NUCLEIQUES



(57) Abstract

Deoxyribonucleotide 5' triphosphate (dNTP) or ribonucleotide 5' triphosphate (NTP) esters for use in a nucleic acid sequencing process without use of a gel and having one of formulae (I), (II), (III) or (IV).

(57) Abrégé

L'invention concerne des esters de désoxyribonucléotides 5' triphosphates (dNTP) ou ribonucléotides 5' triphosphates (NTP) utilisables dans un procédé de séquençage d'acides nucléiques sans gel et répondant à l'une des formules (I), (II), (III) ou (IV).

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Monnaie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**NOUVEAUX DERIVES UTILISABLES  
EN SEQUENCAGE D'ACIDES NUCLEIQUES**

La présente invention est relative à la synthèse de 2'-désoxyribonucléotides-5' triphosphates substitués en position 3' du désoxyribose correspondant aux quatre nucléobases A, T, C et G et leur utilisation dans une nouvelle méthode de séquençage d'acides nucléiques.

La position 3' est estérifiée par un dérivé particulier donnant à chaque nucléotide des propriétés fluorescentes spécifiques.

La synthèse chimique d'un tel composé a déjà été décrite pour le nucléotide dATP par Safarti et al., J. Biol. Chem. (1990), 265, pp. 18902-18906.

L'existence d'un tel composé, ainsi que l'existence de composés voisins avec un ester fluorescent aux propriétés spectrales différentes [Hiratsuka (1982), J. Biol. Chem., 257, pp. 13354-13358] suggère à un scientifique averti que l'on puisse estérifier en position 3' des molécules "reporters" susceptibles d'utilisation pour un procédé de séquençage faisant l'objet de la présente invention.

Ces nucléotides triphosphates estérifiés (3'-RT-dNTP) sont des substrats des ADN ou ARN polymérases lesquels lorsqu'ils sont incorporés conduisent à la terminaison de la chaîne polynucléotidique.

Ils peuvent se prêter à trois réactions distinctes, à savoir l'incorporation par une acide nucléique polymérase dans une chaîne en élongation, la déprotection de l'hydroxyle en 3' du désoxyribose permettant l'incorporation d'un 3'-RT-dNTP suivant. Ces propriétés sont utilisables dans une nouvelle méthode non radioactive ne reposant pas sur l'utilisation d'un gel, pour déterminer une séquence de nucléotides ou détecter des mutations dans une séquence d'ADN.

Une des caractéristiques essentielles de ces nucléotides triphosphates estérifiés est la réversibilité in situ de cette estérification permettant la restauration des groupes 3' hydroxy libres, la chaîne polynucléotidique pouvant subir à nouveau une élongation lors d'une incubation avec un mélange de dNTP et d'ADN polymérase.

Chaque ester de nucléotide ayant des propriétés fluorescentes spécifiques d'une base donnée, il est possible, après élimination et caractérisation de ce marqueur fluorescent de déterminer laquelle des nucléobases a été insérée.

La réitération du procédé fournit ainsi une méthode de détermination d'une séquence de nucléotides ou de détection de mutations ponctuelles dans une séquence de nucléotides ou de recherche de variants ou enfin de diagnostic de la présence d'une séquence oligonucléotidique particulière dans un échantillon.

Les techniques de séquençage classique ont été introduites il y a environ 15 ans par Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. [(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, pp. 5463-5467], d'une part, et par Maxam, A.M. and Gilbert, W. [(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, pp. 560-564], d'autre part.

Le séquençage didésoxy de Sanger est maintenant largement utilisé et est encore une méthode de choix pour déterminer une séquence de nucléotides à partir d'une matrice d'ADN simple brin.

Brièvement, cette méthode est la suivante : pendant les 4 élongations de chaîne enzymatique, les didésoxynucléotides sont insérés de façon aléatoire à la place de leur désoxynucléotide correspondant. Les réactions de séquençage génèrent un mélange complexe qui est ensuite résolu par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Cette méthode est relativement complexe quant aux étapes suivant l'incorporation des didésoxynucléotides, notamment pour ce qui est de la résolution sur gel, d'une part, et d'acquisition de données, d'autre part.

On se trouve en effet en présence d'une grande diversité de produits générés par l'élongation.

Différentes améliorations ont ensuite été apportées à cette technique avec l'objectif de simplifier et d'alléger les manipulations expérimentales qu'elle implique.

Par exemple, dans la demande de brevet EP-0 531 169 A1, les auteurs ont développé une technique permettant de simplifier et d'affiner l'étape d'électrophorèse en utilisant les techniques d'électrophorèse en champ pulsé.

D'autres perfectionnements plus récents des techniques de séquençage ont été décrits dans la littérature. Nous en citerons deux :

- la technique "séquençage de DNA multiplexe" [G.M. Church et S. Kieffer-Higgins, Science, 240, pp. 185-188 (1988)] ;

cette technique implique la formation de génomes artificiels à partir d'un mélange de fragments insérés dans des vecteurs multiples adjacents à différents oligonucléotides marqués ; le DNA est ensuite coupé chimiquement et subit une électrophorèse, puis est transféré sur des membranes et sondé enfin avec des oligonucléotides complémentaires des séquences marquées dans le vecteur ;

- l'autre technique, bien connue, a été décrite dans O. Ohara et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, pp. 6883-6887 (1989) ;

cette technique utilise également des systèmes de gel et de membranes permettant de repérer les fragments hybridés avec les sondes oligomériques.

Dans la demande de brevet international WO93/02212, les inventeurs décrivent un procédé d'amplification et de séquençage d'ADN et d'ARN en une seule étape.

Ce procédé implique l'utilisation d'analogues de nucléotides de type désoxy conduisant à la terminaison de la chaîne et ce, de façon réitérée, la séparation des produits de la réaction étant faite ensuite sur gel de polyacrylamide.

La technologie du séquençage fait l'objet d'études intenses, principalement en raison du développement des projets sur le génome. Beaucoup d'améliorations sont orientées vers la méthode didésoxy au niveau de plusieurs de ces étapes. On pourra citer par exemple les articles de Venter, C.J. et al. [(1992) T.I.B.S. 10, pp.8-11], de Prober, J.M. et al. [(1987) Science 238, pp. 336-341] et de Mathies, R.A. et Huang, X.C. [(1992), Nature 359, pp. 167-169].

De nouvelles approches sont en train d'apparaître, comme le séquençage par hybridation [Strezoska, Z. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, pp. 10089-10093] ou la microscopie à effet tunnel [Driscoll, R. J. et al. (1990) Nature 346, pp. 294-296], lesquelles méthodes peuvent se développer largement si l'électrophorèse sur gel est éliminée et remplacée par une variante simple et peu coûteuse, comme celle de l'invention.

Pour ce qui est des méthodes d'identification d'un nucléotide présent à une position définie dans un acide nucléique, la demande de brevet WO93/02212 décrit une telle méthode d'identification par incorporation d'un didésoxynucléotide, mais cette méthode, si elle permet la détection d'une mutation ponctuelle, ne permet en aucun cas la détermination d'une séquence dans la mesure où aucune possibilité de restauration d'un nucléotide normal après incorporation du nucléotide modifié dans la chaîne en croissance n'est évoquée. De plus, elle nécessite de positionner l'amorce à côté du nucléotide d'intérêt, et

ne permet pas de caractériser des mutations plus complexes comme de petites insertions ou délétions.

Enfin, les didésoxynucléotides sont de fabrication et d'utilisation coûteuses.

La demande de brevet WO91/06678 décrit une méthode d'ADN sans gel et des dispositifs pour mettre en oeuvre cette méthode. La réaction y implique des dTNP bloqués en 3'. Cependant, les enzymes et leur mode d'utilisation cités - notamment la séquenase - ne permettent pas l'utilisation simultanée de nucléotides estérifiés en 3', ni la mise en oeuvre du procédé lorsque l'ADN à séquencer présente des répétitions d'un nucléotide donné ; la séquenase possède en effet une activité estérase intrinsèque.

Une réaction idéale de séquençage produirait un seul produit d'addition de façon contrôlée, permettant l'identification du nucléotide ajouté, avant la répétition du procédé, conduisant à une détermination de la séquence par étape et en temps réel.

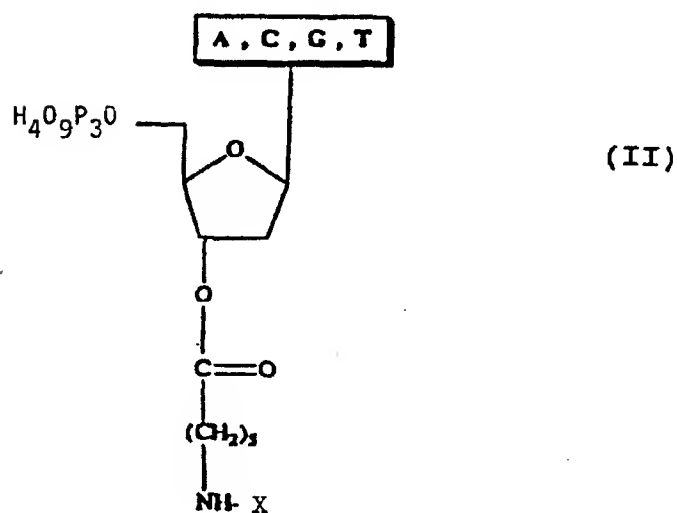
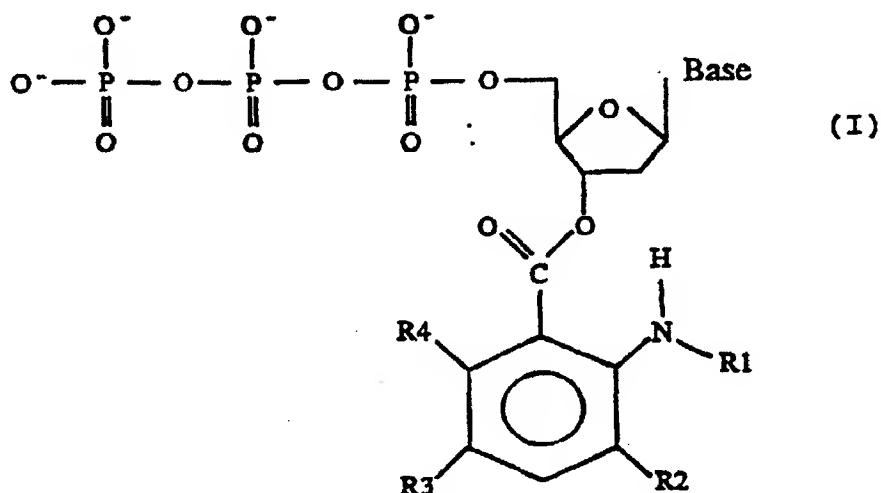
La protection de l'extrémité 3' de la molécule d'ADN en élongation, laquelle protection étant réversible, pourrait être une méthode conférant les propriétés désirées pour une telle réaction. Si, en outre, chaque nucléotide modifié à l'extrémité 3' porte un marquage individuel et distinct, on peut ainsi envisager de déterminer la séquence pas à pas, en temps réel.

L'invention consiste en la synthèse de nouveaux dérivés de dNTP ou de NTP permettant leur utilisation comme terminateurs de croissance de chaîne d'acides nucléiques, cette terminaison pouvant être reversée par hydrolyse chimique ou enzymatique, notamment une estérase, étape du processus étant stable.

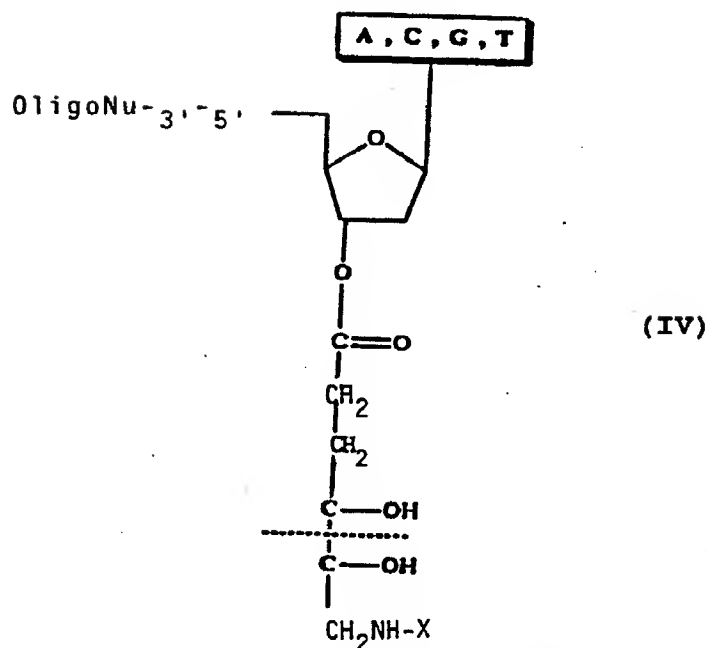
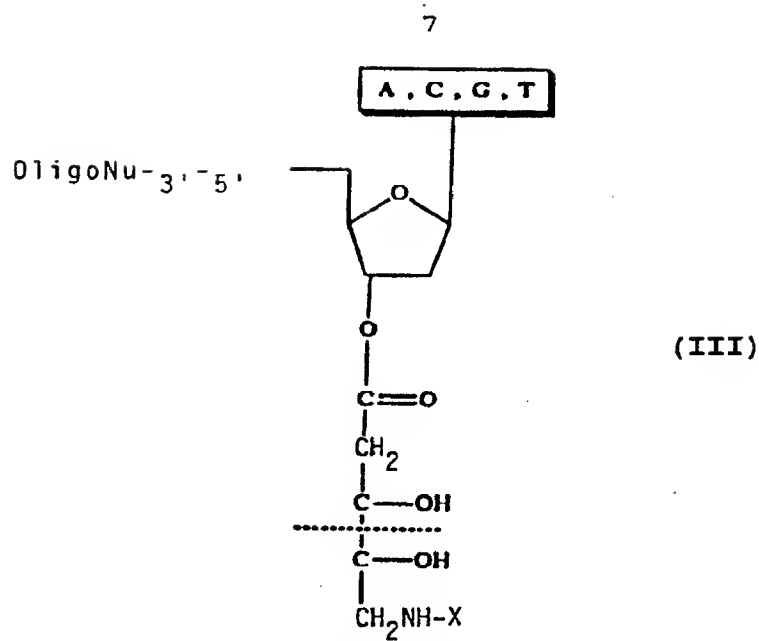
Ces dérivés peuvent être avantageusement utilisés dans tout procédé de séquençage tel que cité ci-dessus caractérisé en ce que le procédé utilise ou non un gel à une quelconque de ses étapes.

Les dNTP ou les NTP de l'invention sont plus particulièrement caractérisés par le fait qu'ils sont estérifiés en 3' soit par des anthranylates, soit par l'acide caproïque amidifié par 4 fluorophores différents correspondant chacun à une base, soit enfin par l'acide 5-amino-2,5-didésoxy-D-ribonique, soit par l'acide 6-amino-2,3,6-tridésoxy-D-gluconique, tous deux également substitués sur la fonction amine par 4 fluorophores différents.

Ces quatre types d'esters étant représentés par les formules I, II, III et IV suivantes :







La restauration de la fonction hydroxyle en 3' du sucre peut être restaurée soit par des bases telle la soude, soit par action d'une enzyme également dans les composés de la formule I et de la formule II. Pour ce qui est des composés de formules III et IV, l'invention

consiste en un clivage du fluorophore en un site éloigné de 2 ou 3 carbones de la position 3' du nucléotide.

Cette réaction chimique génère des groupements réactifs qui produisent alors une réaction secondaire conduisant à la restauration de l'hydroxyle en 3', soit deux étapes qui sont :

- une oxydation du diol vicinal par le periodate,
- une énolisation, puis une  $\beta$ -élimination de l'aldéhyde ainsi formé en 3' pour le composé III,
- une élimination sous l'action de l'hydrazine dans le cas du composé IV (voir les détails dans la figure 9).

L'invention est également relative au procédé de synthèse de ces différentes classes de dNTP estérifiés en 3' conduisant à la synthèse des 4 esters présentant des propriétés fluorométriques différentes.

L'invention est également relative à la construction et à l'utilisation d'une amorce en "épingle à cheveux" phosphorylée en 5' présentant une partie de sa séquence en 3' identique à celle d'une amorce utilisée en PCR pour produire la matrice d'ADN à séquencer (voir exemple ci-dessous).

Le terme d'amorce signifie toute séquence d'oligonucléotides qui, hybridée avec une matrice d'acide nucléique permet à une polymérase d'initier la synthèse du brin complémentaire.

Une amorce en épingle à cheveu est liée de façon covalente par son extrémité 3' à l'extrémité 5' du brin d'acide nucléique portant la séquence recherchée.

L'utilisation de cette amorce en "épingle à cheveux" permet d'utiliser des conditions basiques de déprotection de l'hydroxyle en 3' compatibles avec une réitération du procédé et ce, sans rajout d'amorce à chaque étape de détermination indirecte d'un nucléotide inséré. En effet, la re-hybridation de l'amorce s'effectue intramoléculairement de façon immédiate.

Enfin, l'invention est relative à l'utilisation de ces nucléotides estérifiés dans une méthode de détermination d'une séquence de nucléotides ne reposant pas sur l'utilisation d'un gel. Ladite séquence peut être préalablement amplifiée par la technique PCR.

L'utilisation de ces nucléotides estérifiés peut également être appliquée à la détection de mutations ponctuelles ou des petites mutations type délétions ou additions, ou enfin à la recherche de variants dans une séquence génétique donnée.

Enfin, ces nucléotides triphosphates modifiés peuvent être utilisés dans une méthode de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence oligonucléotidique particulière dans un échantillon.

Enfin, l'invention concerne une trousse de diagnostic comprenant éventuellement une amorce PCR, une amorce de séquençage, 4 2'-désoxyribonucléotides estérifiés en 3' de façon réversible, et éventuellement une phase solide pour immobiliser l'acide nucléique cible ou l'amorce, et enfin une acide nucléique polymérase choisie en fonction de l'amorce.

#### DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION:

L'invention est décrite plus en détail dans la description ci-après accompagnée des figures dont la signification est la suivante :

- La Figure 1 représente la structure des esters d'anthranylates dans laquelle R1 à R4 représentent soit un groupe -H, soit un groupe -CH<sub>3</sub> selon le 3'-RT-dNTP considéré,

- . le 3'-Ant-dATP : R1=R2=R3=R4=H,
- . le N-méthyl-3'-Ant-dCTP : R1=CH<sub>3</sub>; R2=R3=R4=H,
- . le 3-méthyl-3'-Ant-dTTP : R1=R3=R4=H; R2=CH<sub>3</sub> et
- . le 5-méthyl-3'-Ant-dCTP : R1=R2=R4=H; R4=CH<sub>3</sub>.

Toute autre combinaison de groupes substituants sur le cycle anthranylique fait également partie de l'invention.

- La Figure 2 représente la structure des esters d'acides caproïques, et une des voies de synthèse de ces esters.

- La Figure 3 représente la formule des dérivés estérifiés en 3' par l'acide 5-amino-2,5-didésoxy D-ribonique substitué sur la fonction amine par quatre fluorophores différents, et la méthode de restauration de la fonction 3'OH du sucre par action du periodate, puis  $\beta$ -élimination après énolisation.

- La Figure 4 représente la cinétique d'incorporation des dérivés 3'-Ant dATP dans une chaîne en élongation, en fonction de différentes quantités d'ADN polymérase.

- La Figure 5 représente l'incorporation du 3'-Ant dATP en présence de différentes ADN polymérases - l'incubation est effectuée 60 minutes à 37°C avec une unité de chaque enzyme.

- Les Figures 6, 7 et 8 représentent trois variantes de la méthode de séquençage utilisant les 3'-RT-dNTP de l'invention dans lesquelles les symboles ont la signification indiquée sous la Figure 6.

- La figure 9 représente le mécanisme de libération de l'étiquette et de l'hydroxyle en 3' des 2'-désoxynucléotides triphosphates acylés en 3' par l'acide 6-amino 2,3,6-tridésoxy-D-gluconique substitué sur la fonction amine par différents fluorochromes.

- Les Figures 10 et 11 représentent respectivement les schémas de synthèse de la 2'-désoxyadénosine et de la 2'-désoxyguanosine triphosphates acylées en 3' par l'acide 6-amino-caproïque substitué par un fluorochrome.

Les matériels et méthodes utilisés sont les suivants:

- Produits pour la synthèse des dérivés :

L'anhydride isatoïc, l'anhydride N-méthylisatoïc, l'acide 2-amino-3-méthyl-benzoïc, l'acide 2-amino-5-

méthyl-benzoic et l'acide 2-amino-6-méthyl-benzoic proviennent de chez Aldrich. Les anhydrides correspondants ont été préparés par action du phosgène ou du chloroformate d'éthyle sur les acides (Erdmann). Les nucléotides triphosphates, dATP, dGTP, dTTP et dCTP proviennent de chez Boehringer Mannheim.

- Réaction d'incorporation :

L'ADN polymérase modifiée dépourvue d'exonucléase (Sequenase 2,0) provient de USB corp. (USA). Les 2'-3'-didéoxynucléotide / 2'-désoxynucléotide-5'-triphosphates, AMV-reverse transcriptase, M-MuLV reverse transcriptase proviennent de Boehringer (FRA). L'ADN polymérase T7 provient de Pharmacia (France), l'enzyme de Klenow provient d'Amersham (France). Une unité est l'activité enzymatique qui incorpore 1,0 nmole de nucléotides totaux dans un produit insoluble dans l'acide en 1 minute à 37°C avec du poly(d(A-T)) comme matrice.

Les billes magnétiques revêtues de streptavidine (M-280 Dynabeads) proviennent de Dynal (Norvège). Les  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmmole),  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP (600 Ci/mmmole), <sup>3</sup>H-dGTP (14 Ci/mmmole), <sup>3</sup>H-dCTP (17 Ci/mmmole), <sup>3</sup>H-dTTP (45 Ci/mmmole) proviennent d'Amersham (France).

Les oligonucléotides sont synthétisés avec un synthétiseur ABI et purifiés avant emploi.

- Mesures spectrales :

Les spectres d'absorption sont enregistrés à 25°C dans un spectrophotomètre à double faisceau en présence de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Les spectres d'émission de fluorescence et les spectres d'excitation sont mesurés à 25°C dans un spectrophotomètre à fluorescence Perkin-Elmer LS50B. Tous les dérivés d'acide libre sont excités à 310 nm, tandis que les dérivés 3'-anthranyloyles et 3'-méthylanthranyloyles des désoxynucléotides sont excités à 330 nm. Les largeurs de fente pour l'excitation et l'émission sont de 2,5 nm.

Les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission pour chacun de ces dérivés dNTP anthranyloyles, comparées à celles des dérivés non substitués sont résumées dans le tableau I suivant dans lequel R1, R2, R3 et R4 correspondant aux résidus de la Figure 1.

TABLEAU 1

Free Acids						3'-RT- dNTP		
R1	R2	R3	R4	$\lambda_{\text{max}}^*$ absorption	$\lambda_{\text{max}}^*$ emission	dNTP	$\lambda_{\text{max}}^*$ absorption	$\lambda_{\text{max}}^*$ emission
H	H	H	H	315	396.5	dATP	333	427
CH <sub>3</sub>	H	H	H		416.5	dGTP	356	444
H	CH <sub>3</sub>	H	H	312	403	dCTP		432
H	H	CH <sub>3</sub>	H	317	409	dCTP		
H	H	H	CH <sub>3</sub>	289	403	dTTP		435

- Synthèse, purification et caractérisation des 2'-désoxynucléotide-5'-triphosphates marqués en 3' de façon réversible (3'-RT-dNTPs) :

a) Anthranylate dATP :

L'anthranylate dATP a été préparé à partir dATP et d'anhydride isotoïque par un procédé similaire à celui décrit par Hiratsuka [T. Hiratsuka (1982) J. Biol. Chem. 257, pp. 13354-13358] pour la synthèse de l'anthranylate ATP et a été purifié par chromatographie sur Lichroprep RP18 (25-40  $\mu\text{m}$ ), en utilisant 1 mM d'acétate de triéthylammonium comme éluant.

Le dATP n'ayant pas réagi est élué en premier. L'Ant-dATP est ensuite élué avec un mélange d'acétate de triéthylammonium 1 mM et d'acétonitrile (9:1 v/v). Les fractions contenant l'Ant-dATP pur sont testées en

chromatographie en couche mince sur des gels de silice en utilisant comme solvant le mélange  $\text{CHCl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (65:35:10, v/v/v), puis lyophilisées.

20 mg de nucléotide pur (0.032 mol) sont obtenus à partir de 24 mg de dATP (0.04 mol), ce qui représente un rendement final de 80%.

L'identité et la pureté du composé sont vérifiées par spectrophotométrie UV ( $A_{253}/A_{333} = 4.3$ ,  $\epsilon^{253}_{\text{mM}}=20$ ), par spectrométrie de masse (FAB+)  $M^+ 610$ ,  $m/e 611$ ,  $(M+H)^+$ .

Les propriétés spectrales du produit en RMN du proton et du phosphore sont les suivantes, à 300 MHz:

(300 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ ) 8.44(s', 1H, H-8), 8.11 (s, 1H, H-2), 7.83 (d, 1H, H-6A), 7.24 (t, 1 H, H-4A), 6.72 (d, 1H, H-3A), 6.66 (t, 1H, H-5A), 6.48 (dd, 1H, H-1), 5.62 (dd, 1H, H-3'), 4.38 (m, 1H, H-4'), 4.19 (m, 1H, H-5'), 4.09 (m, 1H, H-5''), 2.83 (m, 1H, H-2'), 2.69 (m, 1H, H-2'').  
 $^3\text{P}$  (121.5 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ ) -10.02(d,  $\text{P}_\gamma$ ), -10.84 (d,  $\text{P}_\alpha$ ), -22.48 (t,  $\text{P}_\beta$ ).

b) Anthranylates de dCTP, dGTP et de dTTP :

La synthèse, la purification et la caractérisation ont été effectuées par des méthodes similaires.

Les 3-méthyl, 5-méthyl et 6-méthyl isatoïc anhydrides ont été préparés par le procédé décrit par Erdmann [E. Erdmann (1899) Berichte 3, pp. 2159-2172].

Leurs propriétés spectrales ont également été mesurées, ainsi que celles du N-méthyl Ant-dGTP, du 3-méthyl Ant-dCTP, du 6-méthyl Ant-dTTP et du 5-méthyl Ant-dCTP.

c) Synthèse des esters de dNTP et d'acide caproïque, amidifiés par les fluorophores :

Le schéma est représenté dans la Figure 2.

L'hydroxyle en 5' du 2'-désoxy- nucléoside est protégé par un groupement diméthoxytrityle et l'alcool en position 3' est estérifié par action de l'anhydride de

l'acide caproïque dont l'amine a été préalablement bloquée par un groupement benzyloxycarbone. L'alcool primaire en 5' est libéré en milieu faiblement acide puis phosphorylé. La fonction amine de l'ester caproïque est libérée par hydrogénolyse, puis substituée par le fluorophore.

Dans une dernière étape, le monophosphate activé sous la forme phosphoroimidazolate, est transformé en triphosphate par action du sel de tetra- tri- n-butylammonium de l'acide pyrophosphorique.

d) Synthèse des purines triphosphates acylées en 3' par l'acide 6-amino-caproïque substitué par différents fluorochromes :

2'-désoxy-adénosine (figure 10) :

L'hydroxyle en 5' de la 2'-désoxy-adénosine acylée en 3' est phosphorylé par la chlorure de dibenzyle phosphate ; le phosphate et l'amine sont libérés par hydrogénolyse.

2'-désoxy-guanosine (figure 11) :

Le cas de la 2'-désoxy-guanosine est particulier; en effet, le chlorure de dibenzyle phosphate ne réagit pas avec le 5'OH. Il a été phosphorylé par action du cyanoéthyle phosphate en présence de dicyclocarbodiimide. Au cours de l'hydrogénolyse du groupement benzyloxycarbone, le phosphodiester est transformé en phosphomonoester, par élimination intra-moléculaire du groupement cyanoéthyle. Un schéma de synthèse est représenté sur la Figure 11.

**- Incorporation des 3'-RT-dNTPs :**

Environ 2 picomoles d'un 21-mer- 5'-biotinylé (5'-Bio-ATACTTTAAGGATATGTATCC-3') sont liées à des M-280 Dynabeads de la façon décrite par le fabricant et hybridées avec un excès (environ 50 pmoles) d'un oligonucléotide complémentaire présentant une queue 5'



(dT)<sub>10</sub>, (dC)<sub>5</sub>, (dG)<sub>5</sub> ou (dA)<sub>5</sub>. L'hybridation est faite pendant une heure à température ambiante en présence de NaCl 1M, de Tris-HCl 5 mM (pH 7,5) et d'EDTA 0,5 mM. Après élimination de l'oligonucléotide non lié, les billes lavées sont mises sous suspension dans du tampon fourni par le fabricant et incubées en présence de 500 µM d'un 3'-RT-dNTP unique et d'ADN polymérase à 50°C. La réaction est terminée avec 20 mM d'EDTA, 0,01% de Triton X-100, les billes lavées et leur concentration déterminée au microscope avec une cellule hématocyté avant d'être essayées pour déterminer l'incorporation de la radioactivité (voir ci-après).

Comme ces analogues de nucléotides ne contiennent pas de groupe 3'-hydroxy, leur incorporation dans un brin d'ADN d'élongation aboutit à la terminaison de la chaîne. Ceci est montré dans la Figure 4, dans laquelle un substrat d'ADN est d'abord traité avec un 3'-RT-dATP et une ADN polymérase Taq pendant des périodes de temps différentes, avant d'être lavé et essayé pour déterminer les groupes 3'-hydroxy libres disponibles pour l'élongation de chaîne.

Dans ces conditions, environ 80% du substrat d'ADN sont bloqués pour une élongation supplémentaire dans les 10 minutes avec 10 unités d'enzyme, puis il y a une diminution lente régulière de la quantité de groupes 3'-hydroxy disponibles. Lorsque les 3'-RT-dGTP, 3'-RT-dTTP ou 3'-RT-dCTP sont testés avec leurs matrices respectives, des profils similaires sont obtenus. Si un 3'-RT-dNTP donné est incubé avec une ADN polymérase et une matrice qui ne correspond pas à son propre appariement de bases, aucune terminaison de chaîne ultérieure n'est observée, ce qui indique que le groupe 3' ne modifie pas le mécanisme de reconnaissance de l'enzyme.

Ces résultats montrent que malgré un groupe 3' relativement volumineux, ces nucléotides modifiés sont

encore acceptés par l'enzyme. De nombreux analogues de nucléotides de terminaison de chaîne sont des substrats pour différentes ADN polymérases. On a montré qu'il apparaît un appariement de bases correct du substrat nucléotide avec son brin d'ADN servant de matrice et la formation de liaison phosphodiester même avec des énantiomères de  $\beta$ -L-ribosides [Van Draanen, N. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, pp. 25019-25024], ce qui indique que la liaison de la portion sucre par l'enzyme n'est probablement pas spécifique.

Les nucléotides modifiés de l'invention sont en outre acceptés comme substrats par plusieurs ADN polymérases.

La Figure 5 montre que des analogues synthétisés ici sont des substrats pour différentes ADN polymérases, la Sequenase et la M-MuLV reverse transcriptase étant les plus et moins efficaces dans les conditions testées ici, respectivement. Une ADN polymérase T7 non modifiée, une Taq polymérase et un fragment de Klenow d'ADN polymérase I commercialisé, sont aussi capables d'utiliser ces substrats. La Demanderesse n'a pas essayé d'optimiser l'incorporation avec une ADN polymérase donnée pour ce qui est de l'activité 3' --> 5'-exonucléase, l'aptitude au traitement en fonction de la distributivité, ou les cinétiques de condensation.

Cependant, il apparaît clairement que le procédé ne peut être réitéré pour la base suivante que si l'enzyme condense efficacement le nucléotide en 3' et ne possède pas d'activité exo 3' ---> 5' qui puisse enlever le nucléotide néocondensé.

Il apparaît aussi crucial pour le procédé décrit ici que l'ADN polymérase ne possède pas d'activité estérase intrinsèque à sa chaîne polypeptidique.

Une telle activité existe chez le fragment de Klenow et chez la T7 ADN polymérase, modifiée ou non.

Cette activité est indépendante du degré de purification de l'enzyme, et donc portée par la même protéine que celle possédant l'activité polymérase.

Comme cette activité estérase s'exerce en cours de polymérisation lorsqu'un nucléotide apparié correctement et estérifié en 3', cette activité estérase rend impossible le contrôle de la terminaison de chaîne lorsque les 4 3'-RT-dNTPs sont utilisés en même temps.

Cependant, la Taq ADN polymérase ne possède pas cette activité estérase sous certaines conditions de réaction comme celles décrites ici, et est donc l'enzyme de choix pour le procédé de séquençage décrit ci-après.

**- Elimination des marqueurs fluorescents et restauration de l'hydroxyle en 3' :**

**a) Esters d'anthranylates :**

A cette étape, un marqueur porté en 3' par le nucléotide inséré aurait deux rôles majeurs en établissant une distinction entre les quatre nucléobases possibles insérées et en bloquant un procédé ultérieur d'élongation. L'élimination du marqueur va fournir une identification indirecte de la base insérée ainsi que la régénération d'un groupe 3'-hydroxy libre disponible pour la répétition du procédé.

La nature de la liaison chimique entre la partie ribosyle et les substituants anthranyloyles est particulièrement importante. Les esters carboxyliques sont facilement hydrolysés par des quantités équivalentes d'ions hydroxyde compatibles avec la stabilité chimique des ADN monocaténares [Nucleic Acid Chemistry, Townsend, L.B. and Tipson, S.R. eds., John Willey and Son, New-York et Jencks, W.P. (1969) Catalysis in Chemistry and Enzymology, Dover publication, Inc., New-York]. De plus, de nombreuses différentes estérases et des sérine protéases catalysent l'hydrolyse d'une large variété de ces esters [Heymann, E. et Mentlein, R. (1981) Methods

Enzymol. 77, pp. 333-344], comme le fait la protéinase K sur un 3'-anthranyloyl-2'-dAMP du type I et II décrit page 6. Il pourrait être possible d'estérifier la position 3' avec un marqueur portant un bras d'espacement conçu spécifiquement pour pouvoir être facilement et efficacement éliminé, soit enzymatiquement, soit chimiquement.

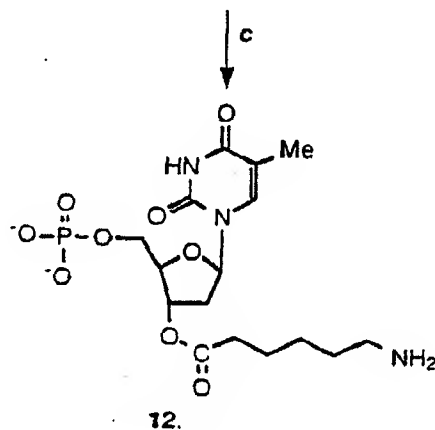
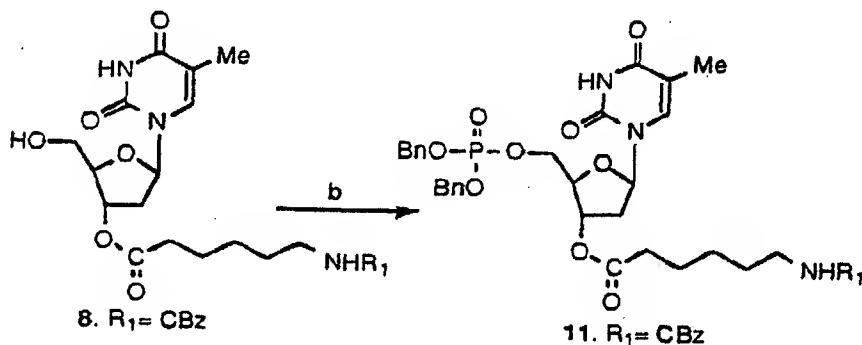
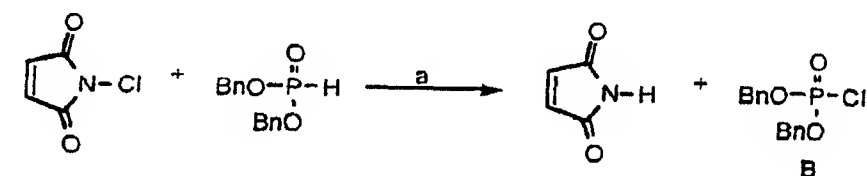
Ensuite, le 3'-RT-dAMP est ajouté au groupe 3'-hydroxy libre d'une matrice d'ADN comme cela est décrit plus haut et l'ester carboxylique ensuite hydrolysé avec de l'hydroxyde de sodium 0,1 M pendant 5 minutes à 37°C (Tableau 2). Après ré-hybridation du brin complémentaire, l'ADN polymérase pourrait incorporer entre 83 et 103% de radioactivité par rapport à la même matrice qui n'a pas été bloquée en 3'. Le fait que l'on ne récupère pas toujours 100% pourrait provenir d'une ré-hybridation incomplète de l'oligonucléotide plus que du traitement alcalin dur. Des conditions analogues d'hydrolyse d'un ester de ribosyle ont été rapportées par d'autres [Falbriard, J.G., Posternak, T. and Sutherland, E.W. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 148, pp. 99-105 et Hiratsuka, T. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, pp. 13354-13358]. La Demanderesse n'a pas observé une notable différence d'efficacité de l'hydrolyse d'ester entre les quatre 3'-RT-dNTPs incorporés.

b) Esters de l'acide caproïque :

La libération de l'acide caproïque substitué par le fluorophore est réalisée par action d'une enzyme, par exemple une lipase ou une hydrolase.

Afin de faciliter la déprotection du phosphate, notamment pour application à des quantités de produits plus importantes, nous nous sommes orientés vers une autre méthode qui utilise comme agent de phosphorylation (P.T. Gilham et H.G. Khorana. *J.A.C.S.* 1958, 80:6212-6222), le chlorure de dibenzyle phosphate

(composé B; figure 9). Bien qu'elle soit assez limitative (48%) pour la synthèse, cette solution offre un avantage non négligeable. En effet, à partir du composé (11), on obtient le composé (12) en une seule étape d'hydrogénolyse effectuée dans des conditions douces (température ambiante et pression atmosphérique).



(a): toluène; N<sub>2</sub>; 25° C.  
 (b): B; pyridine; N<sub>2</sub>; -20° C.  
 (c): Pd/BaSO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>; EtOH 90%.

Pour la déprotection du composé (11), par hydrogénolyse (P.T. Gilham et H.G. Khorana. J.A.C.S. 1958, 80:6212-6222), nous avons essayé plusieurs conditions expérimentales:

- plusieurs solvants; acétate d'éthyle, éthanol, éthanol à 90% et tétrahydrofuranne;
- deux catalyseurs; palladium sur charbon et sur sulfate de barium.

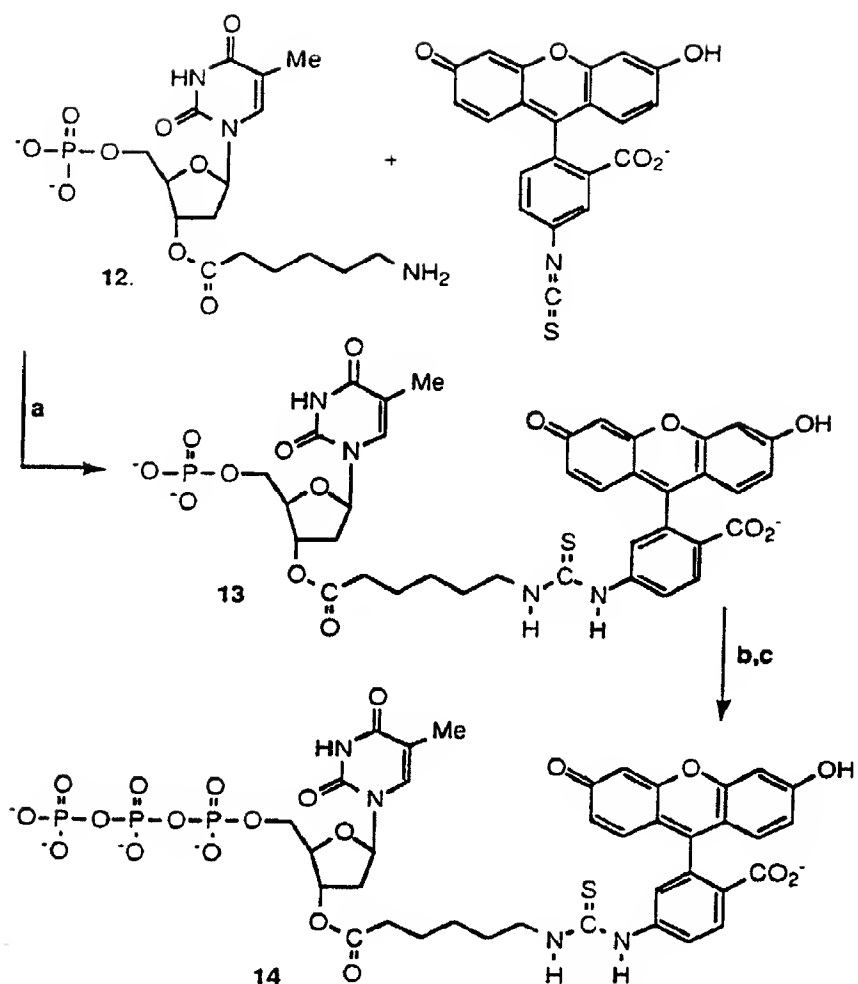
L'éthanol à 90%, en présence de palladium sur sulfate de barium, s'est avéré être le solvant idéal. En effet, dans celui-ci, la déprotection totale (perte des benzyles et du benzyloxycarbonyle) est quantitative et l'isolement du phosphomonoester, estérifié en 3' (composé 12) est assez aisé.

Pour la thymidine, nous avons choisi de lui assigner comme étiquette la fluorescéine (INTERBIotech. Molecular Probes; "1992-1994 Handbook of fluorescent probes and research chemicals". 1992, 20-41) (FITC), celle-ci répondant aux critères établis précédemment :

- étiquette non radioactive ;
- absorption ( $\epsilon = 76.10^3 \text{ l. mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  à  $\lambda_{\text{max}}=495 \text{ nm}$  dans le DMF et à pH=9) et émission à  $\lambda_{\text{max}}=519 \text{ nm}$ , toutes deux élevées.

Généralement, une fonction amine réagit avec une fonction isothiocyanate à un pH voisin de 11 (cette réaction a déjà été réalisée au laboratoire (S.R. Sarfati et A. Namane, Tet. Let. 1990, 31:2581-2584). Or, nous savons qu'à ce pH la chaîne aliphatique greffée en 3' est hydrolysée. Pour pallier cet inconvénient, nous avons fait agir le composé (12) avec la 5-isothiocyanate-fluorescéine dans un mélange pyridine/eau, à température ambiante. Ces conditions ont été décrites pour l'acide 6-amino-caproïque et la 5-isothiocyanate-fluorescéine par F.S. Wusteman et P. Gacesa (Carbohydrates Research, 1993, 241:237-244) (schéma ci-dessous).

Cette méthode nous a permis, à la fois de ne pas observer la formation de TMP, comme cela a lieu en milieu alcalin et de récupérer la fraction du composé (12) qui n'avait pas réagi. Par ailleurs, les difficultés que nous avons rencontrées, vis-à-vis de la solubilité du produit nous ont amenés à évaluer le rendement par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur une colonne à polarité de phase inversée et à ne purifier par ce moyen que la quantité nécessaire à la caractérisation du produit.



(a): pyridine/eau; 25° C. (b): carbonyle diimidazole; DMF; 25° C.  
 (c):  $P_2O_7^{4-}$  ( $Bu_3N^+H$ )<sub>4</sub>; DMF; 25° C.

A partir du composé (13), nous avons deux possibilités pour réaliser le triphosphate de l'analogue de la thymidine (composé 14). Une première méthode consiste à préparer le phosphoromorpholide et à déplacer la morpholine par le sel de tétra-tri-n-



butylammonium de l'acide pyrophosphorique (J.G. Moffat et H.G. Khorana, J.A.C.S., 1961, 83:649-658), une seconde à traiter le composé (13) par le carbonyldiimidazole, puis à déplacer l'imidazole par le même sel d'acide pyrophosphorique (Y. Tor et P.D. Dervan, J.A.C.S., 1993, 115:4461-4467 ; R. Tipson et B. Townsed, Nucleic Acid Chemistry, Part 4 (Wiley-Interscience Publication, New-York) 1991, 337-340).

Nous avons choisi cette seconde méthode, en raison des conditions basiques et de température élevée nécessitées par la première, susceptibles d'hydrolyser la chaîne aliphatique placée en 3'. Cette étape a été réalisée sur une petite échelle et sur le phosphomonoester (composé 13) non purifié, sachant que l'isolement du composé (14) nécessiterait une purification par CLHP.

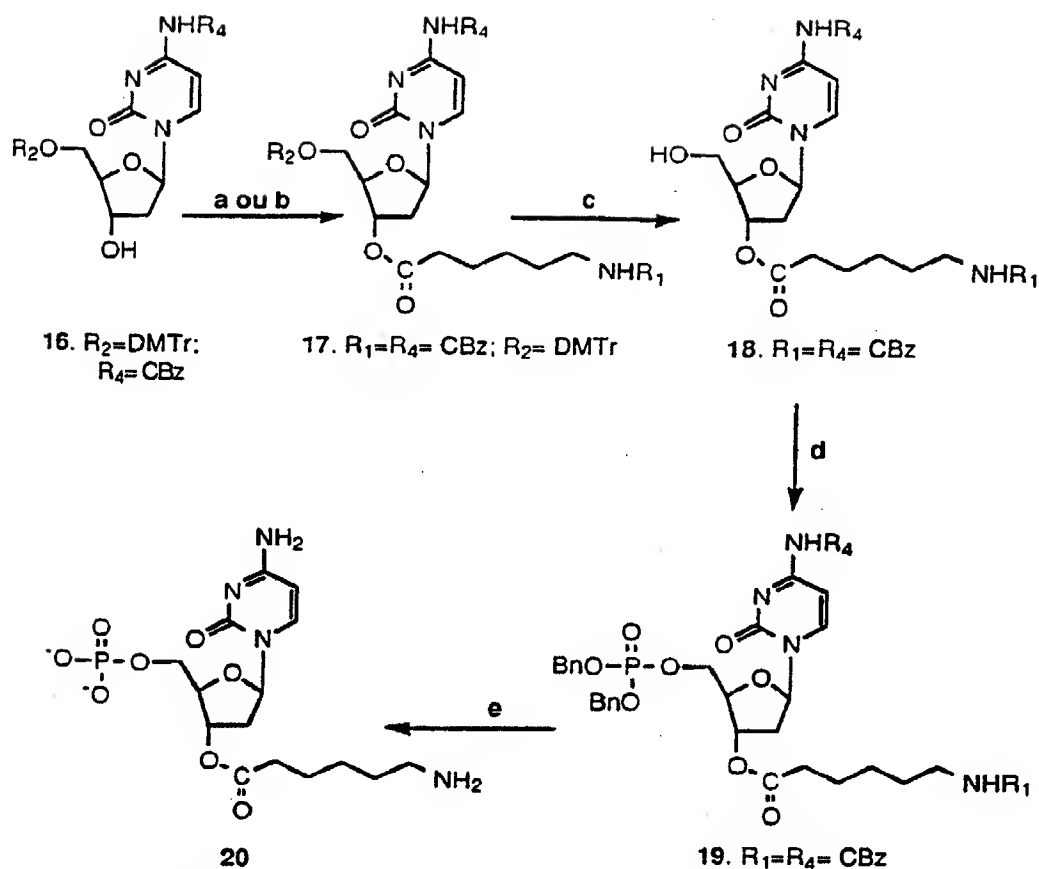
Un autre mode de protection particulièrement avantageux est représenté par la synthèse des analogues triphosphates de la 2'-désoxycytidine ; l'avantage de cette méthode en est que les quatre groupements hydrogénalisables du composé (19) peuvent être éliminés en une seule étape qui est l'étape (e).

**- Synthèse des analogues triphosphates de la 2'-désoxycytidine :**

Partant de dC, nous avons protégé, à l'aide du 1-(benzyloxycarbonyl) 3-éthylimidazolium tétrafluoroborate, l'amine aromatique portée par la base selon les conditions de Rappoport et al. (B.E. Watkins, J.S. Kiely et H. Rappoport, J.A.C.S., 1982, 104:5702-5708) et la fonction alcool primaire 5' par diméthoxytritylation (M.J. Gait, Oligonucleotides synthesis a practical approach (IRL Press at Oxford University Press), 1984, 27-34 et 51 ; H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch et H.G. Khorana, J.A.C.S. 1963, 85:3821-3827) (composé 16; figure 11).

Nous avons ensuite introduit la chaîne aliphatique par action de l'anhydride (6') sur le composé (16) (D.H. Rammner et H.G. Khorana, J.A.C.S. 1963, 85:1997-2002). Cette synthèse du composé (17) a aussi été réalisée par acylation "directe" du composé (6) sur le composé (16), en présence de 1,8-dicyclohexylcarbodiimide (DCCI), dans des conditions stoechiométriques et avec un rendement équivalent (85%).

Après déprotection de la fonction hydroxyle primaire 5' du composé (17), effectuée en milieu acide comme décrit (M.J. Gait, Oligonucleotides synthesis a practical approach (IRL Press at Oxford University Press), 1984, 27-34 et 51 ; H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch et H.G. Khorana, J.A.C.S. 1963, 85:3821-3827), nous avons phosphorylé le composé (18) par action du chlorure de dibenzyle phosphate (P.T. Gilham et H.G. Khorana. J.A.C.S. 1958, 80:6212-6222) (composé B ; figure 9). Cette étape, assez limitative (48%), a permis d'obtenir le composé (19) attendu. Sa déprotection, par hydrogénolyse (P.T. Gilham et H.G. Khorana. J.A.C.S. 1958, 80:6212-6222 ; B.E. Watkins, J.S. Kiely et H. Rappoport, J.A.C.S., 1982, 104:5702-5708 ; J.H. Rigby, T.L. Moore et S. Rege, J.O.C. 1986, 51:2400-2402), a été réalisée dans des conditions identiques à celles employées pour l'analogue de la thymidine et avec un rendement élevé (78%).



(a): 6; DCCl; DMAP;  $\text{CH}_3\text{CN}$ ;  $25^\circ\text{C}$ .

(b): 6; DMAP;  $\text{CH}_3\text{CN}$ ;  $25^\circ\text{C}$ . (c):  $\text{PhSO}_3\text{H}$  2%;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  70 /  $\text{MeOH}$  30.

(d): B; pyridine;  $\text{N}_2$ ;  $-20^\circ\text{C}$ . (e):  $\text{Pd/BaSO}_4$ ;  $\text{H}_2$ ;  $\text{EtOH}$  90%.

Nous avons ensuite choisi dans un premier temps comme étiquette de la 2'-désoxycytidine (dC), l'acide N-méthylisatoïque (figure 13) pour plusieurs raisons :

- l'action de l'anhydride N-méthylisatoïque n'affecte pas l'amine aromatique portée par la base

pyrimidique de dC (B. Canard et R.S. Sarfati, 1994 (Gene, sous presse) ;

- cette étiquette, excitée à  $\lambda_{\text{max}}=338$  nm, émet à une longueur d'onde,  $\lambda_{\text{max}}=416,5$  nm, distincte de celle de la fluorescéine ( $\lambda_{\text{max}}$  d'émission=519 nm) ;

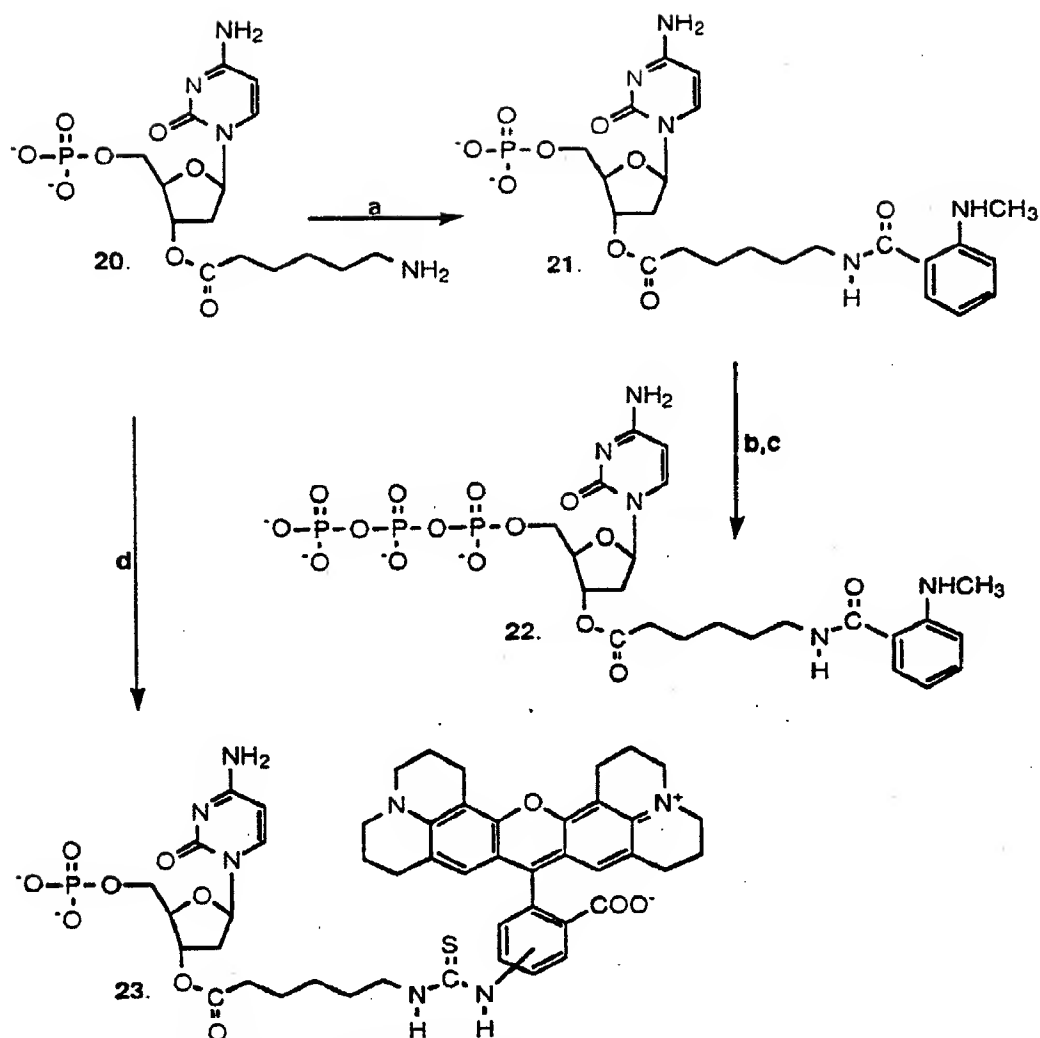
- la synthèse du composé (21) nous permettrait de vérifier rapidement si notre stratégie pour obtenir le triphosphate, à partir du monophosphate étiqueté en 3' par l'intermédiaire de la chaîne aliphatique (composé 6), était bonne.

A partir du composé (21) synthétisé dans les mêmes conditions expérimentales que pour l'analogue de la thymidine avec la 5-isothiocyanate-fluorescéine (F.S. Wusteman et P. Gacesa Carbohydrates Research, 1993, 241:237-244), nous avons préparé le triphosphate, par traitement successif du composé (21) avec le carbonyldiimidazole et avec l'acide pyrophosphorique, sel de tétra-tri-n-butylammonium (Y. Tor et P.D. Dervan, J.A.C.S., 1993, 115:4461-4467 ; R. Tipson et B. Townsed, Nucleic Acid Chemistry, Part 4 (Wiley-Interscience Publication, New-York) 1991, 337-340). Le composé (22), ainsi obtenu, a été purifié par chromatographie et caractérisé par résonance magnétique nucléaire du phosphore.

Ces bons résultats ont incité à étiquetter, également, le composé (20) avec la rhodamine (INTERBIotech. Molecular Probes; "1992-1994 Handbook of fluorescent probes and research chemicals". 1992, 20-41). En effet, cette dernière fluoresce beaucoup plus fortement que l'acide N-méthylisatoïque et à une longueur d'onde, toujours distincte de celle de la fluorescéine,  $\lambda_{\text{max}}$  d'émission=596 nm.

En raison de la faible solubilité du composé (23), seulement, une fraction a été purifiée par CLHP pour le caractériser.

27



(a): anhydride N-méthylisatoïque; pyridine/eau; 25° C.

(b): carbonyle diimidazole; DMF; 25° C.

(c):  $P_2O_7^{4-}$  ( $Bu_3N^+H$ )<sub>4</sub>; DMF; 25° C.

(d): chlorure d'isothiocyanate de rhodamine; pyridine/eau;  $NaHCO_3$ ; 25°C.

c) Esters de l'acide 5-amino-2,5-didésoxy D-ribonique :

Le schéma de la Figure 3 indique comment la libération et la restauration du groupe hydroxyle sont réalisées : le diol vicinal est oxydé par le periodate,

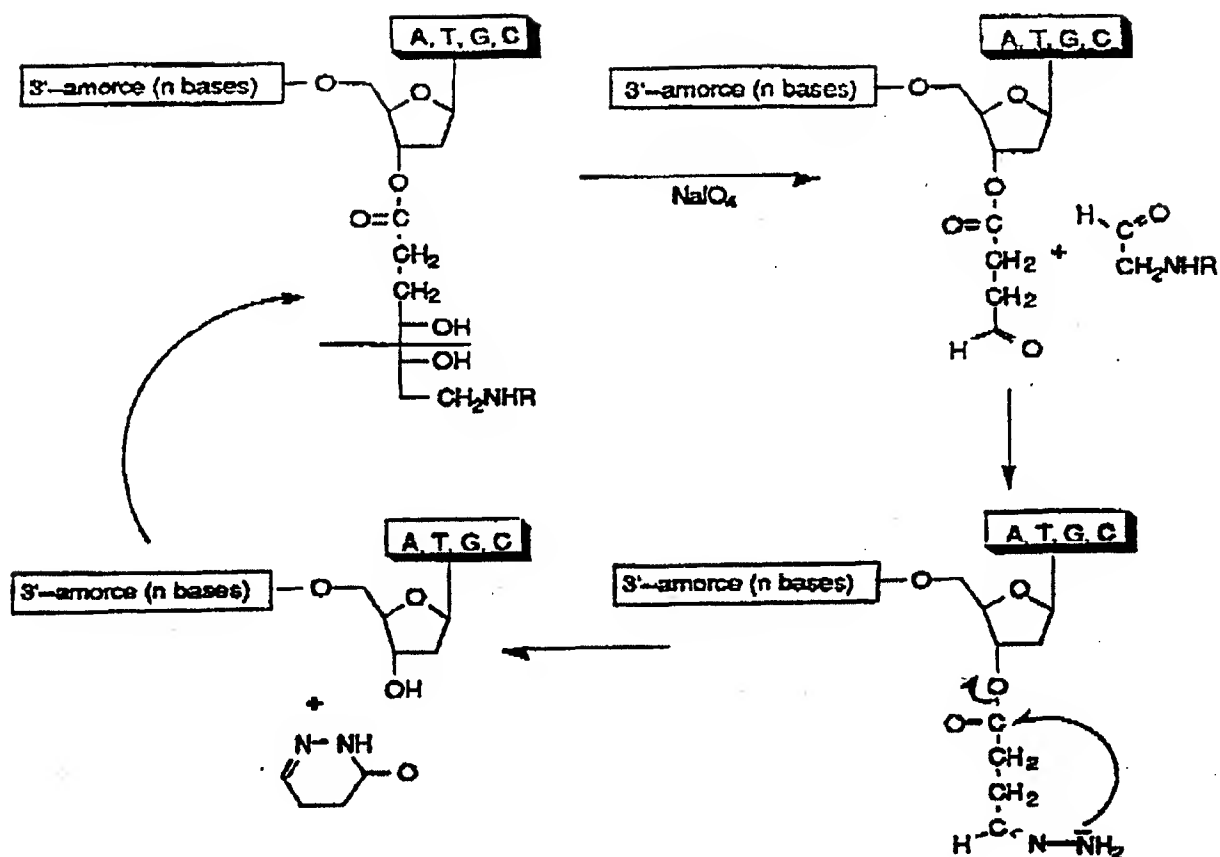
cette oxydation conduisant, d'une part, à un aldéhyde substitué par le fluorophore dont l'absorption et l'émission de fluorescence peuvent être mesurées par les méthodes décrites plus haut, et, d'autre part, à un oligonucléotide substitué par un aldéhyde, lequel, après enolisation, est éliminé par  $\beta$ -élimination, libérant ainsi l'hydroxyle en 3'.

L'utilisation d'une oxydation par le periodate est compatible avec une nouvelle élongation sans re-hybridation de l'amorce puisque ces conditions ne dénaturent pas l'ADN double chaîne tel l'amorce hybridée sur la matrice à séquencer.

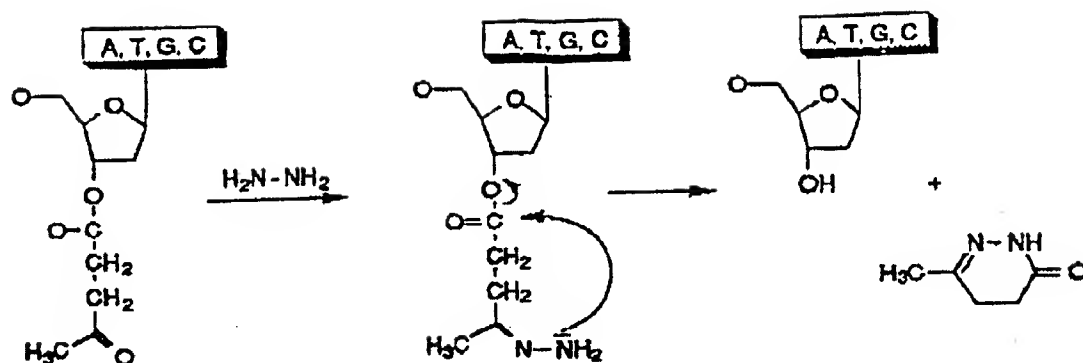
L'ensemble des opérations peut être ainsi réitéré jusqu'à ce que la séquence d'intérêt soit entièrement séquencée.

Le schéma de la figure 9 illustre bien les avantages de ce type de composés ; en effet, en synthèse oligonucléotidique, les sucres sont souvent temporairement protégés sous la forme d'esters de l'acide lévulinique, les lévulinates (J.H. VanBoom et al., Tetrahedron Lett. 4875 (1976)). Entre autres intérêts de ces esters, la déprotection des alcools est quantitative en 1 minute, à pH neutre et à température ambiante. Dans ces conditions, les oligonucléotides sont stables.

Les nucléotides acylés en 3' par l'acide 6-amino-2,3,6-tridésoxy-D-gluconique oxydés par le periodate, libèrent quantitativement le fluorochrome et un ester qui ne diffère de l'ester lévulinique que par le remplacement d'un méthyle par un hydrogène (une cétone par un aldéhyde).



Les alcools sont régénérés par le mécanisme suivant: dans un mélange hydrazine-pyridine-acide acétique-eau, à pH neutre, la fonction cétone est transformée en hydrazone, le doublet libre sur l'azote attaque le carbonyle et l'alcool est libéré.



Les hydrazones se forment plus facilement à partir des aldéhydes que des cétones, la restauration du 3'-OH devrait donc être plus rapide à partir d'un aldéhyde.

Ce type de composés présente donc de nombreux avantages : ils sont déprotégeables rapidement à température ambiante, à pH neutre et surtout quantitativement.

- Exemple d'un séquençage de nucléotide le long du gène rpoB d'une souche résistante à la rifampicine de Mycobacterium leprae :

La démonstration que le procédé décrit ci-dessus peut être utilisé pour identifier les séquences de nucléotides dans un mélange complexe d'acides nucléiques simple chaîne dans un tube ou dans une colonne, laquelle méthode évite l'étape d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, est illustrée par l'exemple ci-dessous.

1) Echantillon d'ADN et cible de séquençage :

Dans cet exemple, la séquence nucléotidique destinée à être analysée est une partie du gène de la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase de Mycobacterium leprae (rpoB).



Un changement d'un amino acide dans le codon 425 dans le gène confère à la bactérie une résistance à la rifampicine. Des mutations aux positions 1, 2 ou 3 dans le codon sauvage ont été déjà décrites et qui remplacent une serine par une leucine, une phénylalanine ou méthionine [Honoré N. et Cole S.T. (1993), Antimicrobiol. Agence and Chemotherapy 37, n° 3, pp. 414-418].

Le matériel biologique de départ est obtenu comme décrit dans la référence ci-dessus mentionnée ; brièvement, des cellules de M. leprae résistantes à la rifampicine sont extraites de la plante de pied de souris et sont lysées par une technique de congélation/ébullition et les échantillons soumis à une amplification par PCR en utilisant les amorces 1 et 2 spécifiques du gène rpoB. Le produit d'amplification est ensuite analysé par électrophorèse en gel d'agarose et utilisé comme un échantillon d'ADN de départ dans le présent exemple.

2) Amorce oligonucléotidique :

L'amorce 1 et le Brpo B22 de la référence ci-dessus. C'est une amorce 5' biotinylée avec la séquence suivante:

5'-CAGGACGTCGAGGCGATCAC-3'.

L'amorce 2 est choisie dans la séquence adjacente au nucléotide à analyser dans le codon 425 du gène rpoB.

Il est constitué de 21 nucléotides avec la séquence suivante :

5'-CAAACCACCCGGGCCCAGCGC-3'

laquelle séquence correspond au type sauvage du gène rpoB de M. leprae en aval du codon 425.

L'amorce 3 est l'amorce en "épingle à cheveux" décrite dans le texte ci-dessus et dans la Figure 7.

Son extrémité 5' est phosphorylée et a la séquence nucléotidique suivante :

5'-GGGCGGCGGGGCTTTATTTGCCCCGCCGCCCAAACCACCCGGGCCCAGCGC-3'.

Ces amorces ont été obtenues sous une forme purifiée auprès de la Société GENSET corp. (Paris, France).

### 3) Préparation des matrices pour le séquençage :

Les amorces 1 et 2 sont utilisées exactement comme décrit dans la référence ci-dessus (Honoré et al.) pour produire un fragment d'amplification par PCR utilisable pour le séquençage du codon 425 d'un échantillon inconnu de M. leprae dans un volume de réaction final de 100  $\mu$ l.

Un aliquot (10  $\mu$ l) est analysé par électrophorèse en gel d'agarose pour vérifier que l'amplification PCR est correcte.

100  $\mu$ l du produit d'amplification PCR sont ensuite absorbés sur des billes magnétiques (M280 Dynabeads, streptavidine, Dynal corp., Norvège) recouvertes de streptavidine et prélavées et les chaînes d'ADN non biotinylées et dénaturées et élevées de sa chaîne complémentaire qui reste liée aux billes en utilisant 0,1 M de NaOH tel que décrit par le fabricant.

Après plusieurs lavages, la matrice d'ADN simple chaîne liée au support est dans une forme purifiée sans interférer avec des amorces ou des nucléotides.

### 4) Ligation de l'amorce en "épingle à cheveux" n° 3:

La matrice liée au support est resuspendue dans un tampon de ligation (40 mM Tris pH 7.5, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM DTT, 0,5 mM ATP), 5 nm de l'amorce n° 3 en "épingle à cheveux" sont ajoutés au mélange, le tube est chauffé 2 minutes à 69°C et 30 minutes à 37°C.

Après l'addition de 40 unités d'ADN ligase T4 (Boehringer corp., Allemagne), le mélange est incubé pendant 3 h à température ambiante avec agitation de temps en temps.

Le produit ainsi lié attaché aux billes et lavé plusieurs fois comme cela est décrit par le fabricant, le dernier lavage étant dans un tampon TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) et enfin resuspendu dans 120  $\mu$ l d'eau distillée stérile.

## 5) Réaction de séquençage :

a) Incorporation d'un 3' RT-dNMP à l'extrémité 3' OH de l'amorce 3 en "épingle à cheveux" lié (matrice de séquençage) :

La matrice de séquençage est maintenant étendue par l'amorce en "épingle à cheveux" qui donne une extrémité 3' OH bloquée (voir Figure 7). La solution suivante (solution d'élongation) est ajoutée à la matrice liée aux billes :

- 10  $\mu$ l d'un tampon concentré 10 fois (donné par le fabricant),
- 10  $\mu$ l de glycérol,
- 50  $\mu$ l de 3' RT-dNTP à la concentration de 2 mM chacun: 3'-anthranyloyle dATP, 3'-N-méthyl-anthranyloyle dGTP, 3'-5-méthyl-anthranyloyle dCTP, 3'-6-méthyl-anthranyloyle dTTP,
- 10  $\mu$ l de Taq polymérase (5 unités/ $\mu$ l, Boehringer corp., Allemagne).

Le tube est incubé à 50°C pendant 30 minutes avec une agitation douce occasionnelle et ensuite transféré sur un séparateur magnétique pour éliminer les nucléotides non incorporés : 3 lavages avec 10 mM de Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 0,02% Triton X-100, suivis par 2 lavages avec 0,02% de Triton X-100 et 1 lavage avec de l'eau distillée stérile.

## b) Elimination de la protection en 3' :

L'eau distillée stérile est enlevée et 30  $\mu$ l de NaOH 0,1 M sont ajoutés directement sur les billes.

L'incubation est ensuite réalisée à 50°C pendant 10 minutes. L'échantillon est ensuite magnétisé, le surnageant collecté, 30  $\mu$ l de 0,1 M NaOH sont ajoutés de nouveau sur les billes et incubés à 50°C pendant 10 minutes, puis après une séparation magnétique, le deuxième surnageant est mélangé avec le premier avant l'analyse spectrofluorométrique.

Les billes sont immédiatement lavées exactement comme ci-dessus après l'étape d'incorporation et 120  $\mu$ l de la suspension de billes est maintenant prête pour une nouvelle réaction d'extension.

c) Identification du marquage en 3' correspondant au nucléotide incorporé :

6,6  $\mu$ l de Tris 0,5 M pH 8 sont ajoutés aux surnageants rassemblés et le mélange est soumis à une analyse spectrofluorométrique comme décrit plus haut en utilisant un spectrofluoromètre Perkin-Elmer L50B et la cellule de détection spectrofluorométrique HPLC correspondante.

La calibration est réalisée en utilisant des solutions témoins contenant 0,1 M NaOH et 50 mM Tris pH 8.

Des spectres individuels correspondant aux 4 dérivés dépourvus d'anthranylate sont réalisés dans le même tampon et leur émission maximale déterminée.

Ensuite, leurs spectres d'excitation sont déterminés comme décrit plus haut.

De cette manière, chaque marqueur est défini avec deux longueurs d'ondes spécifiques, à savoir le maximum en nanomètres pour l'excitation et pour l'émission.

Après avoir chargé l'échantillon dans la cellule de détection, l'excitation est réalisée à 310 nm et le spectre d'émission est mesuré entre 340 nm et 500 nm.

Le spectre est corrigé de tout effet venant du tampon en soustrayant le spectre du témoin, la courbe est lissée et les longueurs d'ondes correspondant au maximum décrit ci-dessus sont déterminées en utilisant un programme d'ordinateur fourni par le fabricant.

Les surnageants soumis à l'analyse spectrofluorométrique donnent comme résultat 317 nm et 409 nm pour les maximum d'excitation et d'émission respectivement.

Ceci identifie de façon non ambiguë un résidu dC incorporé à l'extrémité 3' de la matrice de séquençage.

6) Réitération du procédé : séquençage du codon 425 du gène rpoB de M. leprae d'un isolat résistant à la rifampicine :

Les 120 µl de suspension de billes sont maintenant soumis de nouveau aux étapes 5 a), b), c) de la réaction de séquençage, afin d'identifier le nucléotide suivant du codon 425 de l'isolat résistant à la rifampicine de M. leprae.

Dans ce cas, les maximum d'excitation et d'émission sont de 315 nm et de 397 nm respectivement et ceci identifie un résidu dA incorporé après le dC de la précédente réaction.

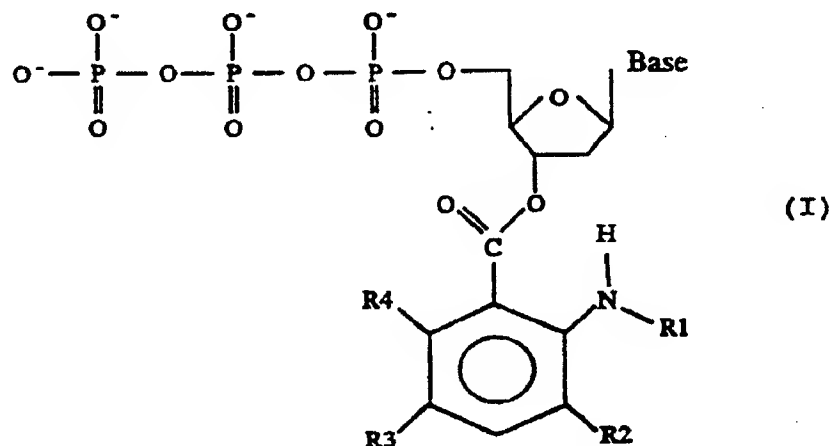
Le cycle de séquençage complet suivant (étape 5 a), b), c)) identifie les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission à 289 nm et 403 nm respectivement, ce qui est typique d'un résidu dT incorporé à l'extrémité 3' de la matrice de séquençage.

Ainsi, des expériences nous concluons que la séquence nucléotidique du codon 425 du gène rpoB de l'échantillon analysé est ATG, ce qui code pour une méthionine au lieu d'une serine, la dernière étant caractéristique du phénotype sauvage.

Du fait que cette sorte de mutation a été décrite dans des isolats de type rpoB3 (voir Honoré N. et al.), les expériences décrites ci-dessus donnent les bases moléculaires de la résistance à la rifampicine dans le gène de l'isolat de M. leprae.

## REVENDICATIONS

1. Esters de désoxyribonucléotides 5' triphosphates (dNTP) ou ribonucléotides 5' triphosphates (NTP), caractérisés par le fait qu'ils sont des anthranylates répondant à la formule générale suivante :



dans laquelle R1, R2, R3 ou R4 sont soit un atome d'hydrogène (H), soit un groupe méthyle (CH<sub>3</sub>), soit un groupe autre pourvu que les propriétés du résidu soient conservées,

et dans laquelle l'hydroxyle en 3' peut être restauré par libération du dérivé anthranylique en milieu basique ou par action d'une enzyme, par exemple une lipase ou une hydrolase.

2. Esters selon la revendication 1, caractérisés par les substitutions suivantes :

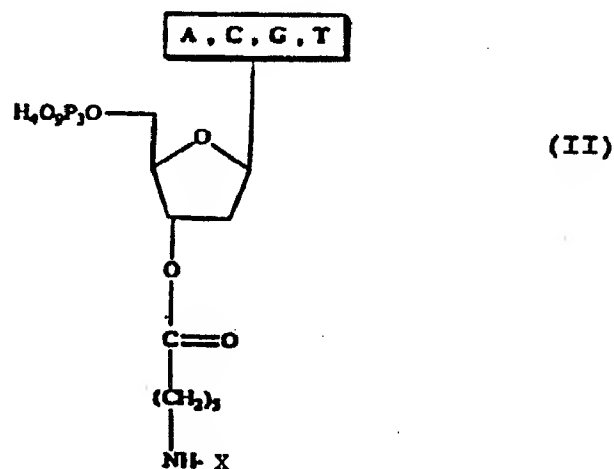
R1=R2=R3=R4=H dans le 3' anthranylate-dATP

R1=CH<sub>3</sub>, R2=R3=R4=H dans le N-méthyl 3' anthranylate-dGTP

R2=CH<sub>3</sub>, R1=R3=R4=H dans le 3-méthyl 3' anthranylate-dTTP

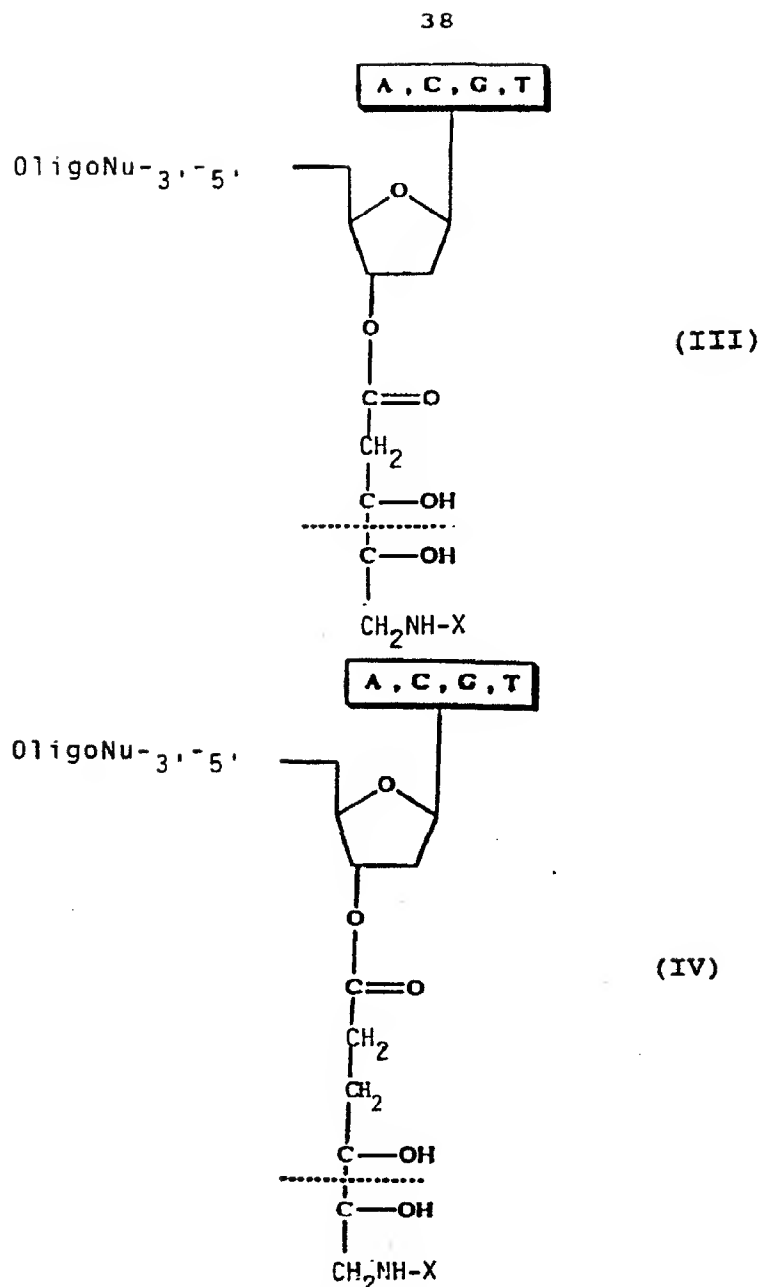
R4=CH<sub>3</sub>, R1=R2=R4=H dans le 5-méthyl 3' anthranylate-dCTP.

3. Esters de désoxyribonucléotides 5' triphosphates (dNTP) ou ribonucléotides 5' triphosphates (NTP), caractérisés par la formule suivante :



dans laquelle l'hydroxyle en 3' peut être restauré par libération de l'acide caproïque substitué par un quelconque fluorophore en milieu basique ou par action d'une enzyme, par exemple une lipase ou une hydrolase.

4. Esters de désoxyribonucléotides 5' triphosphates (dNTP) ou ribonucléotides 5' triphosphates (NTP), caractérisés en ce qu'ils répondent à l'une des formules suivantes:



dans laquelle X représente une substance susceptible de donner un signal, notamment un fluorophore, ou un hydrogène, et dans laquelle l'hydroxyle en 3' peut être libéré en deux étapes qui sont :

- une oxydation du diol vicinal par le periodate,



- une énolisation et  $\beta$ -élimination de l'aldéhyde en 3'.

5. Utilisation des esters selon l'une des revendications 1 à 4, dans un procédé de séquençage d'une chaîne polynucléotidique comprenant les étapes de :

- a) construction et utilisation d'une amorce,
- b) addition à partir de cette amorce, ou de toute autre amorce, par une acide nucléique polymérase, d'une nucléotide triphosphate estérifié en 3'OH de telle façon que son intégration bloque toute élongation ultérieure et que l'ester porte un marquage spécifique de chacune des quatre bases constituant ces nucléotides modifiés,
- c) restauration de la fonction 3'OH par hydrolyse chimique ou enzymatique de l'ester formé,
- d) caractérisation de l'hydrolysats formé caractéristique d'un nucléotide donné,
- e) réitération des étapes a), b), c) et d) pour caractériser le nucléotide suivant.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'amorce et une amorce en "épingle à cheveux" phosphorylée en 5' et présentant une partie de sa séquence en 3' identique à celle d'une amorce utilisée en PCR pour produire la matrice d'ADN à séquencer et qui, après ligation à la matrice d'ADN à séquencer, cette amorce est compatible avec une déprotection en milieu basique.

7. Utilisation selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'ester est porteur d'un composé détectable en fluorescence, les caractéristiques d'excitation et d'émission dudit composé étant caractéristiques pour chacun des quatre nucléotides.

8. Utilisation des esters selon l'une des revendications 1 à 4 à la détection de mutations ponctuelles dans une séquence d'acides nucléiques, ou de variants impliquant entre 2 et 20 nucléotides.

9. Utilisation des esters selon l'une des revendications 1 à 4 à la recherche d'une séquence particulière dans un mélange complexes d'acides nucléiques.

10. Trousse de diagnostic de la présence dans un échantillon d'une séquence d'acides nucléiques que l'on souhaite analyser et comprenant :

- une amorce de séquençage,
- 4 désoxyribonucléotides estérifiés en 3' de façon réversible,
- éventuellement une phase solide pour immobiliser l'acide nucléique à analyser ou l'amorce,
- une acide nucléique polymérase choisie en fonction de l'amorce, et préférentiellement sans activité 3' ---> 5' exonucléasique, préférentiellement l'ADN Taq polymérase.

1/15

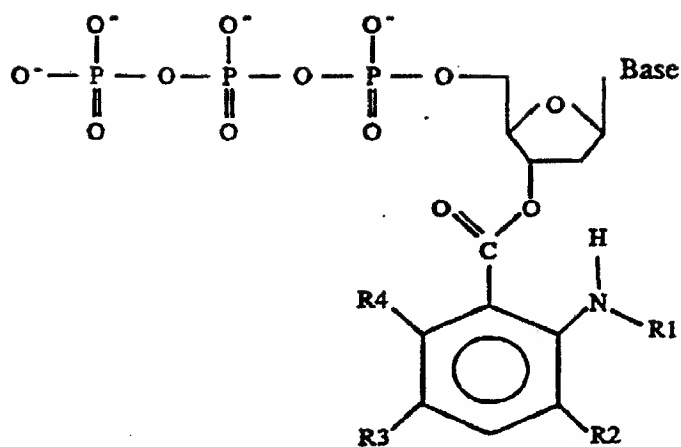


Figure 1



3/15

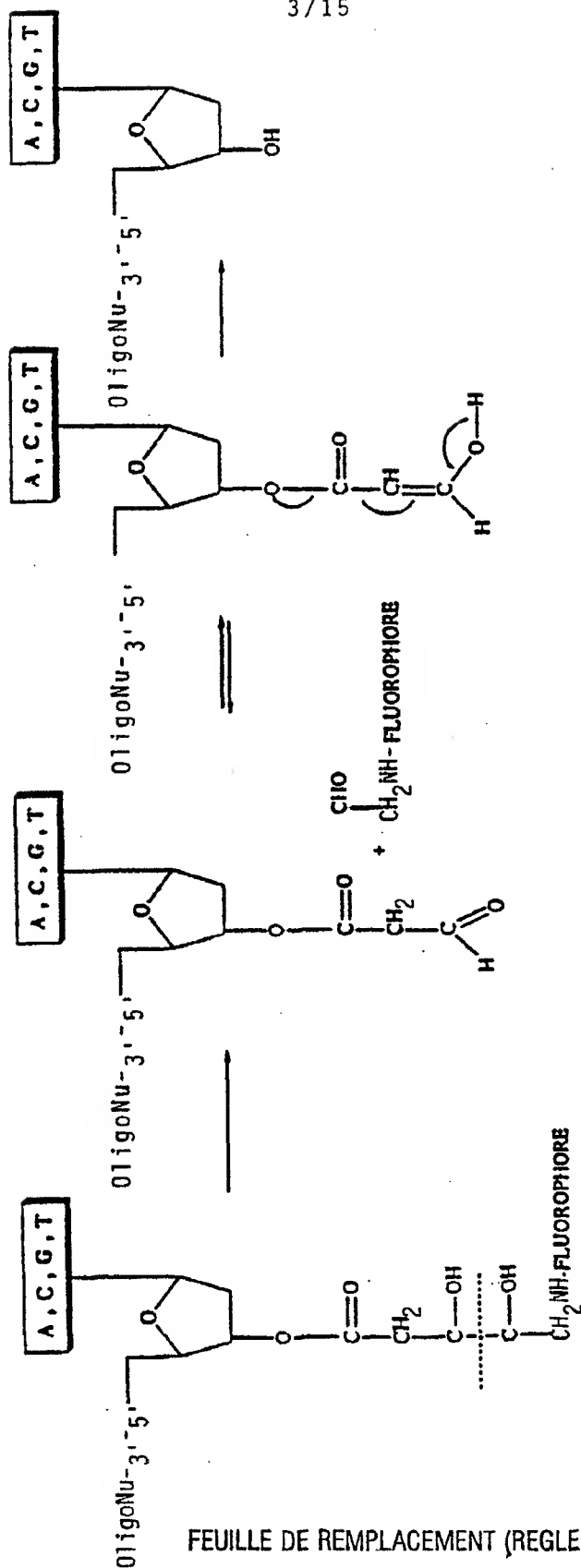


Figure 3

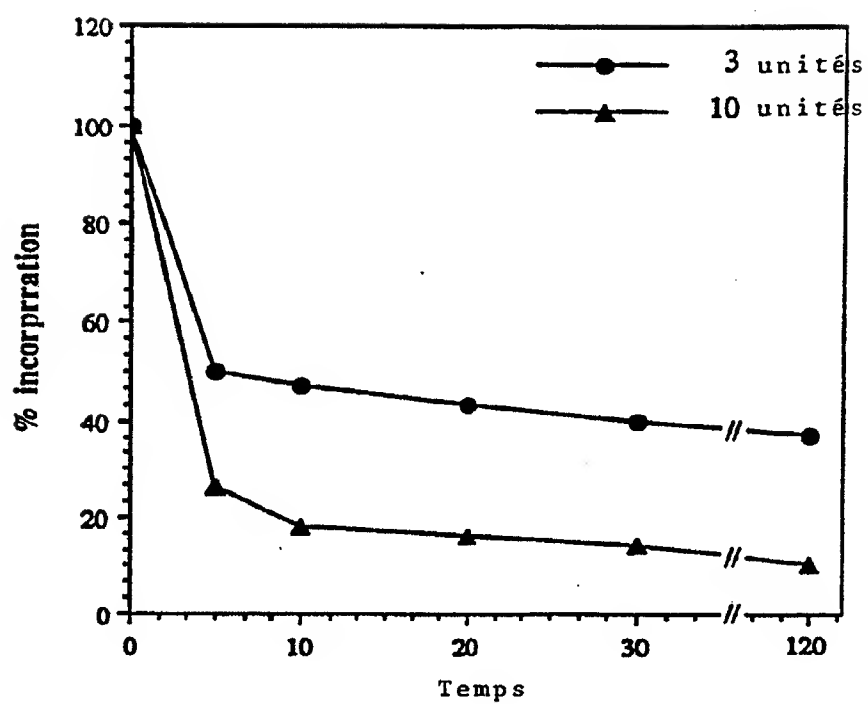


Figure 4

5/15

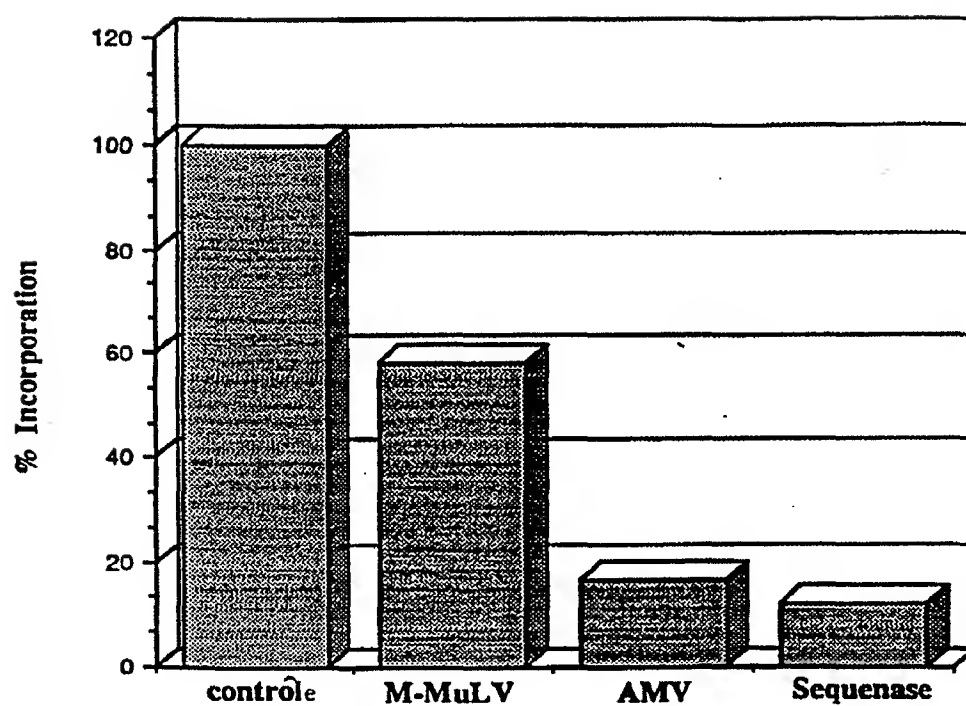


Figure 5

6/15

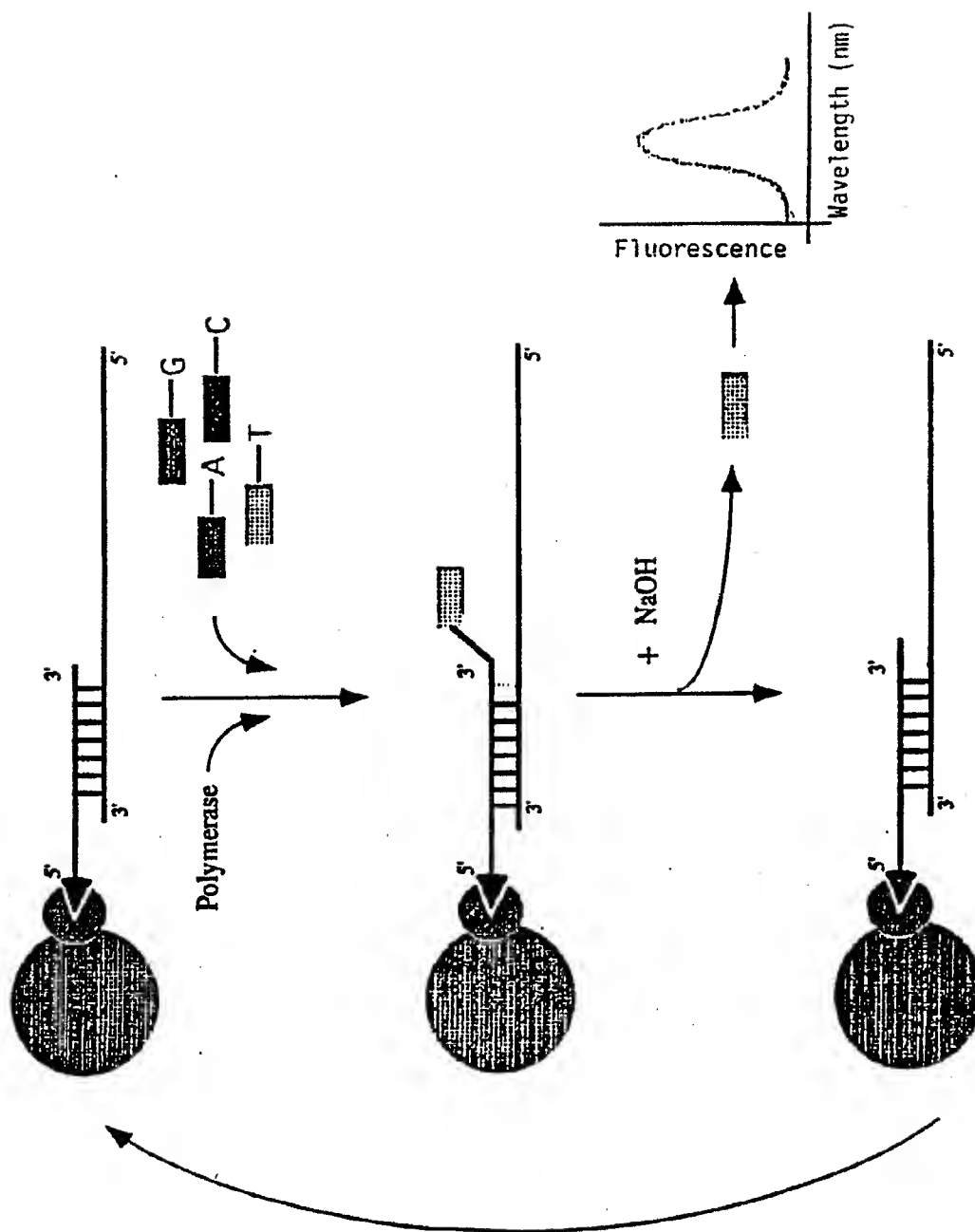


Figure 6



7/15

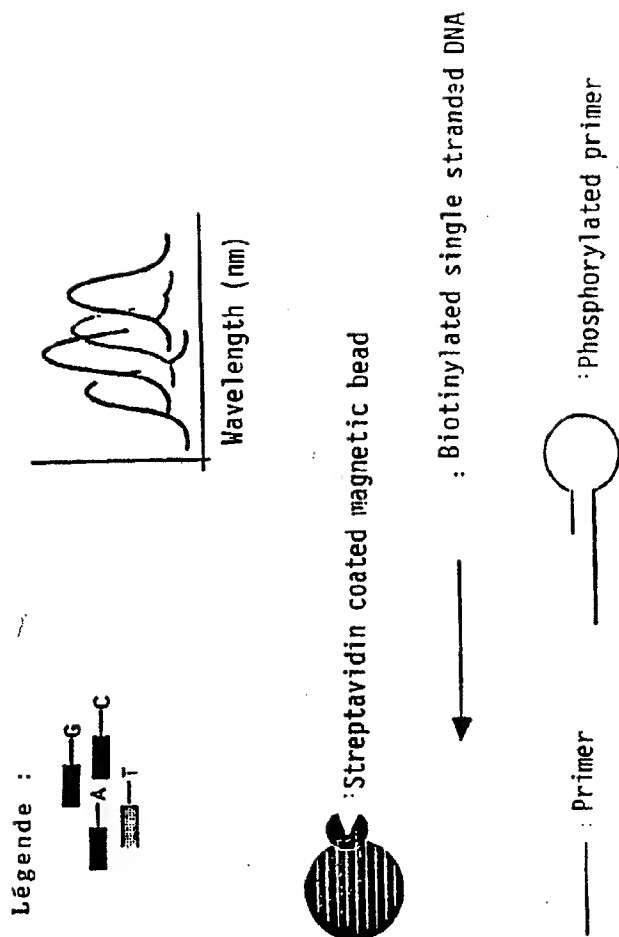


Figure 6 suite

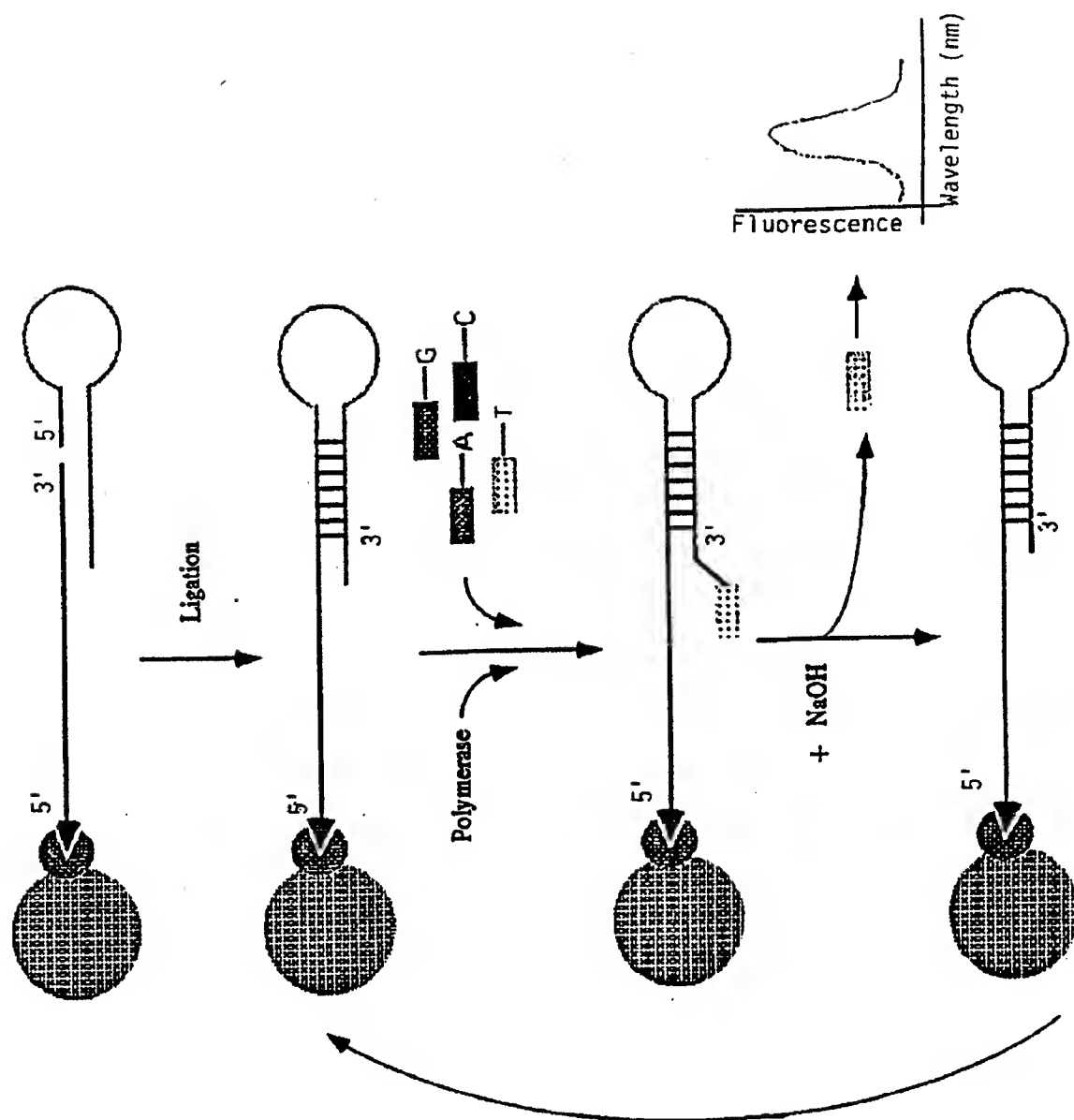


Figure 7

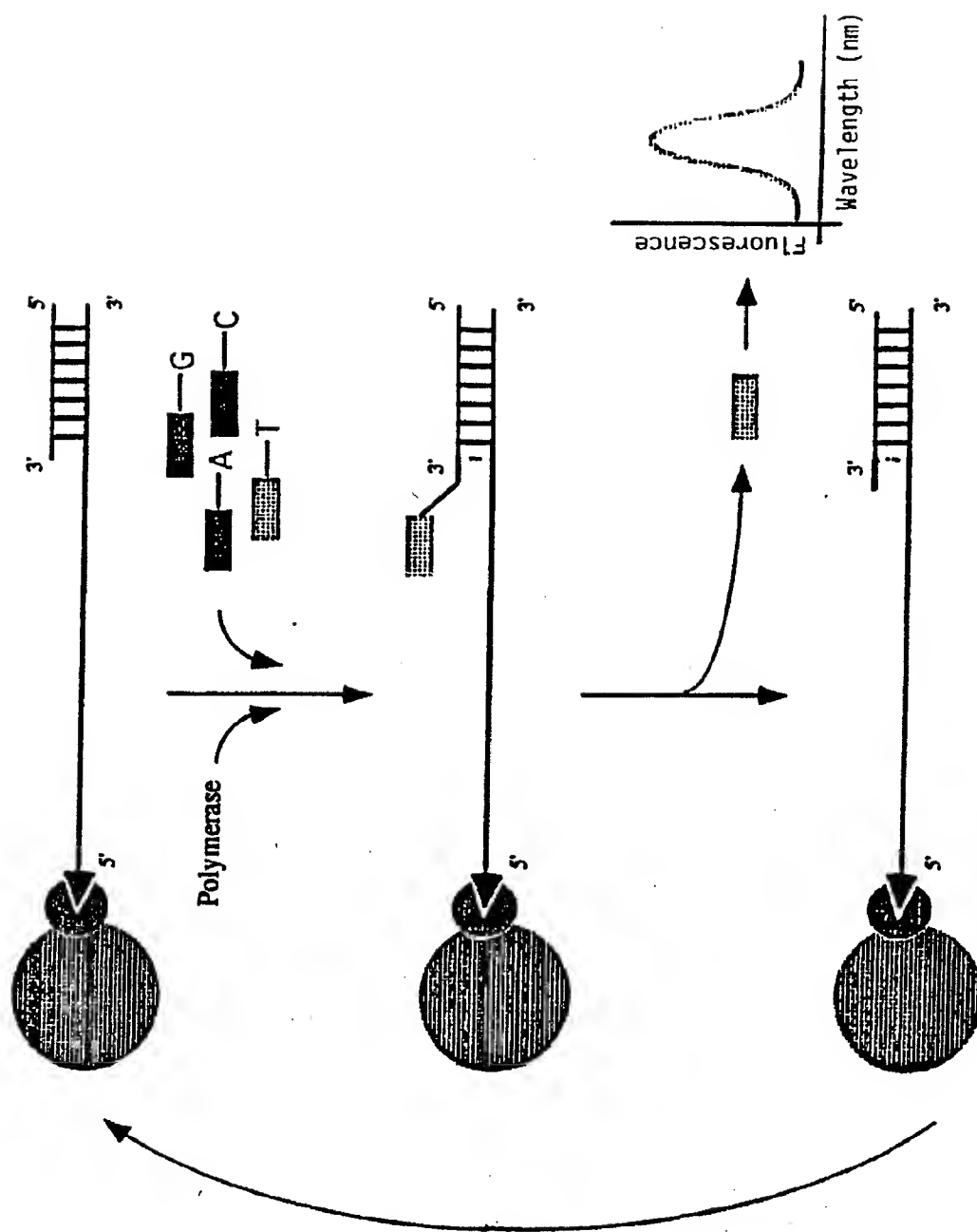


Figure 8

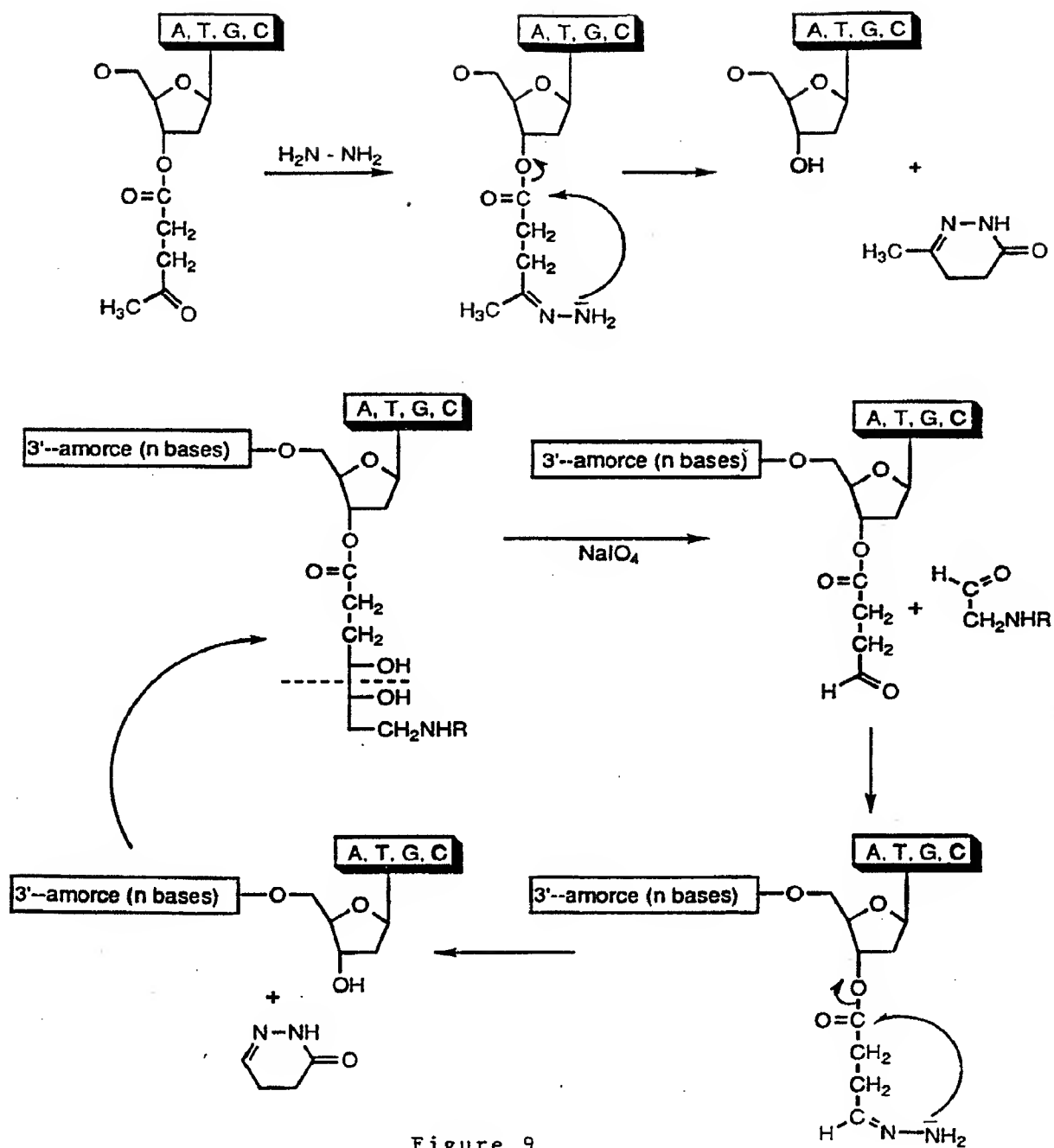


Figure 9

11 / 15

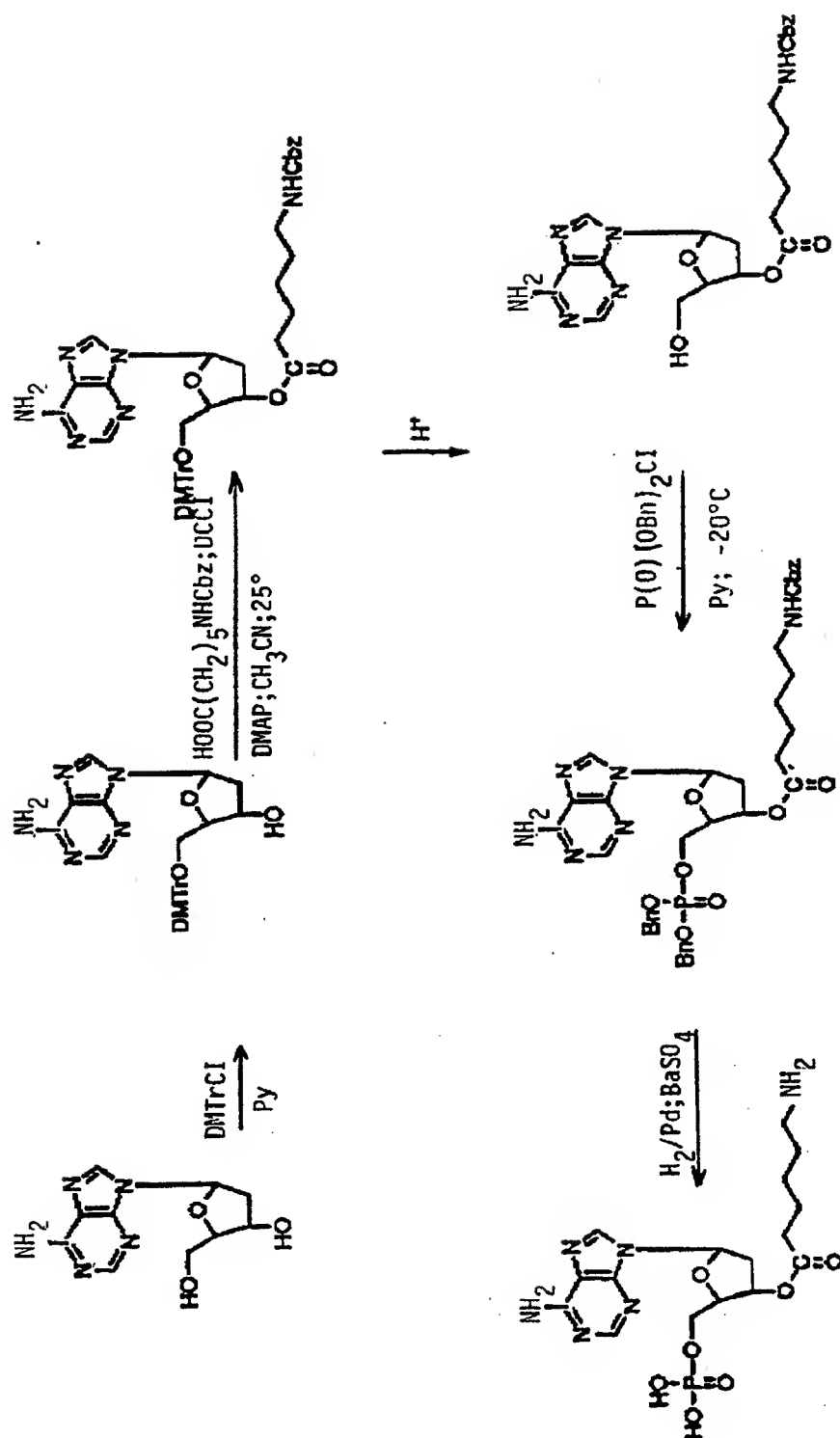
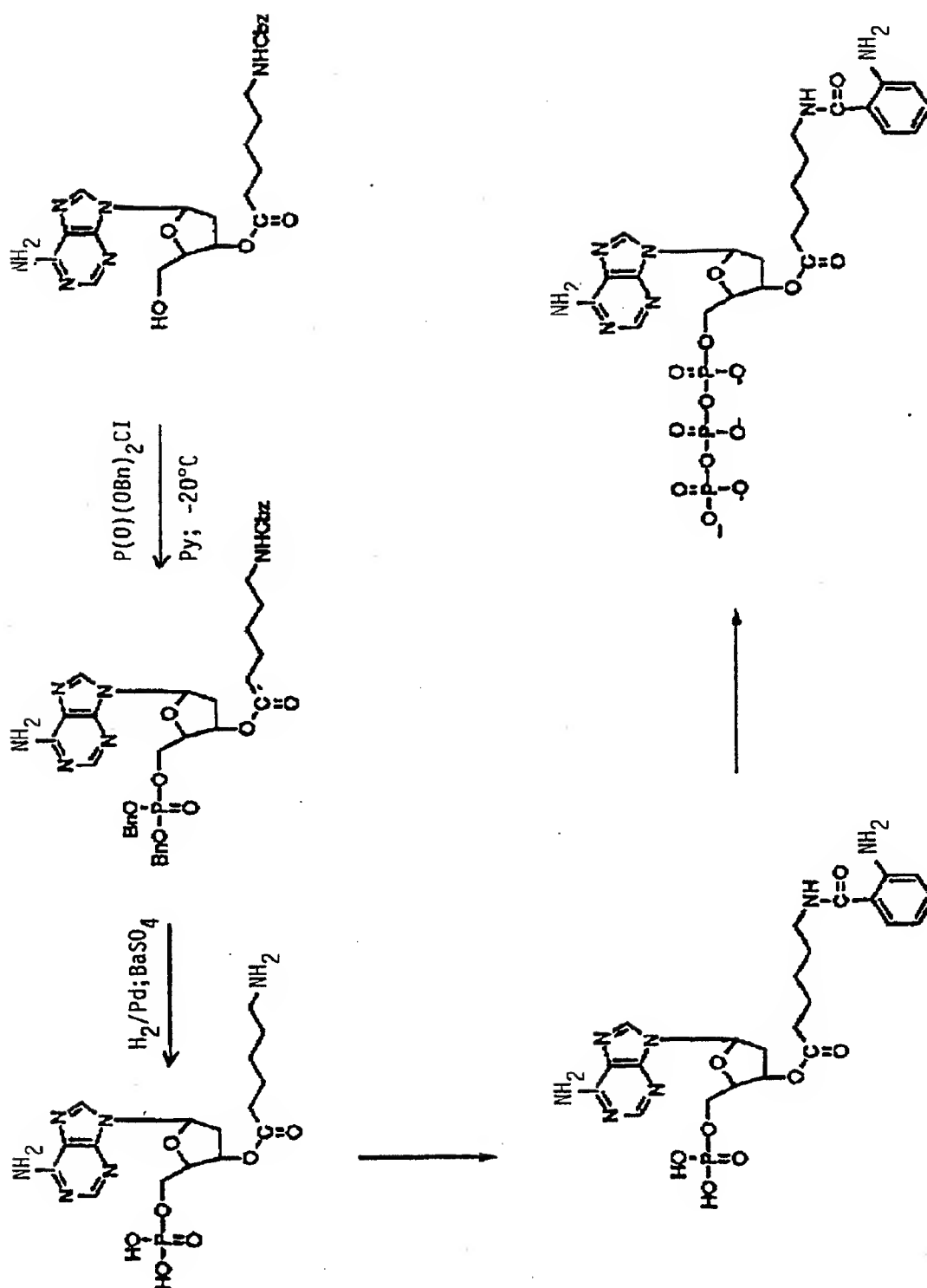


Figure 10



**Figure 10 suite**

13/15

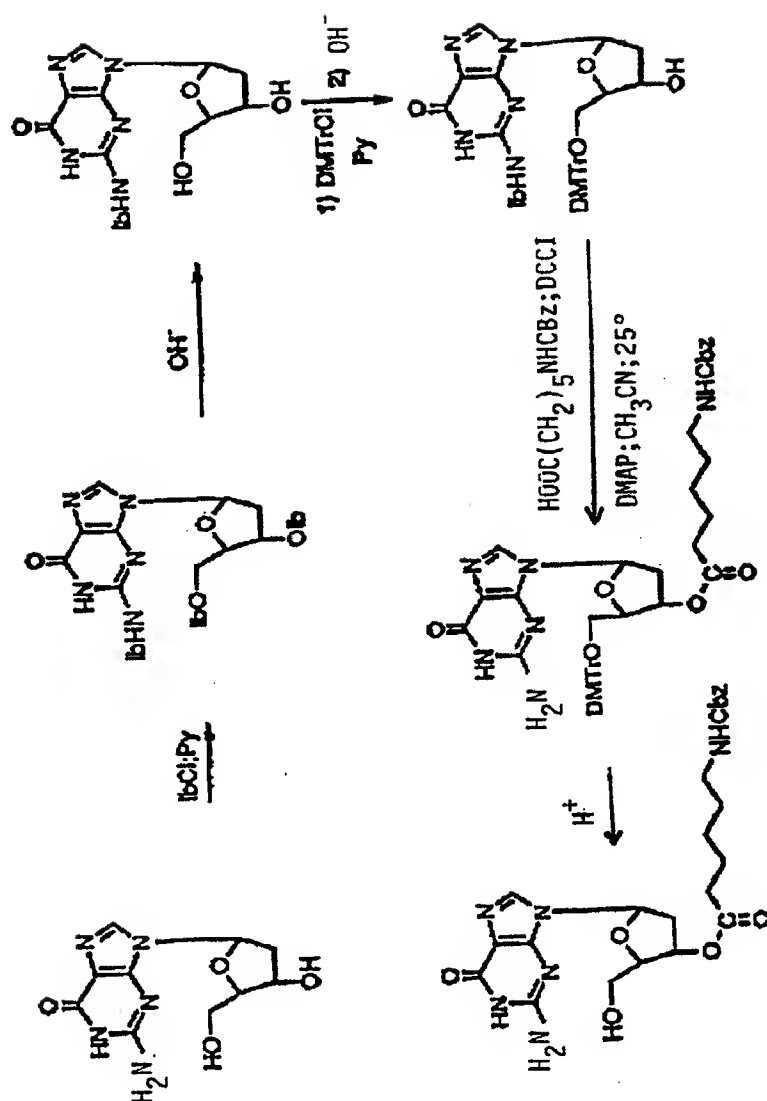


Figure 11

14/15

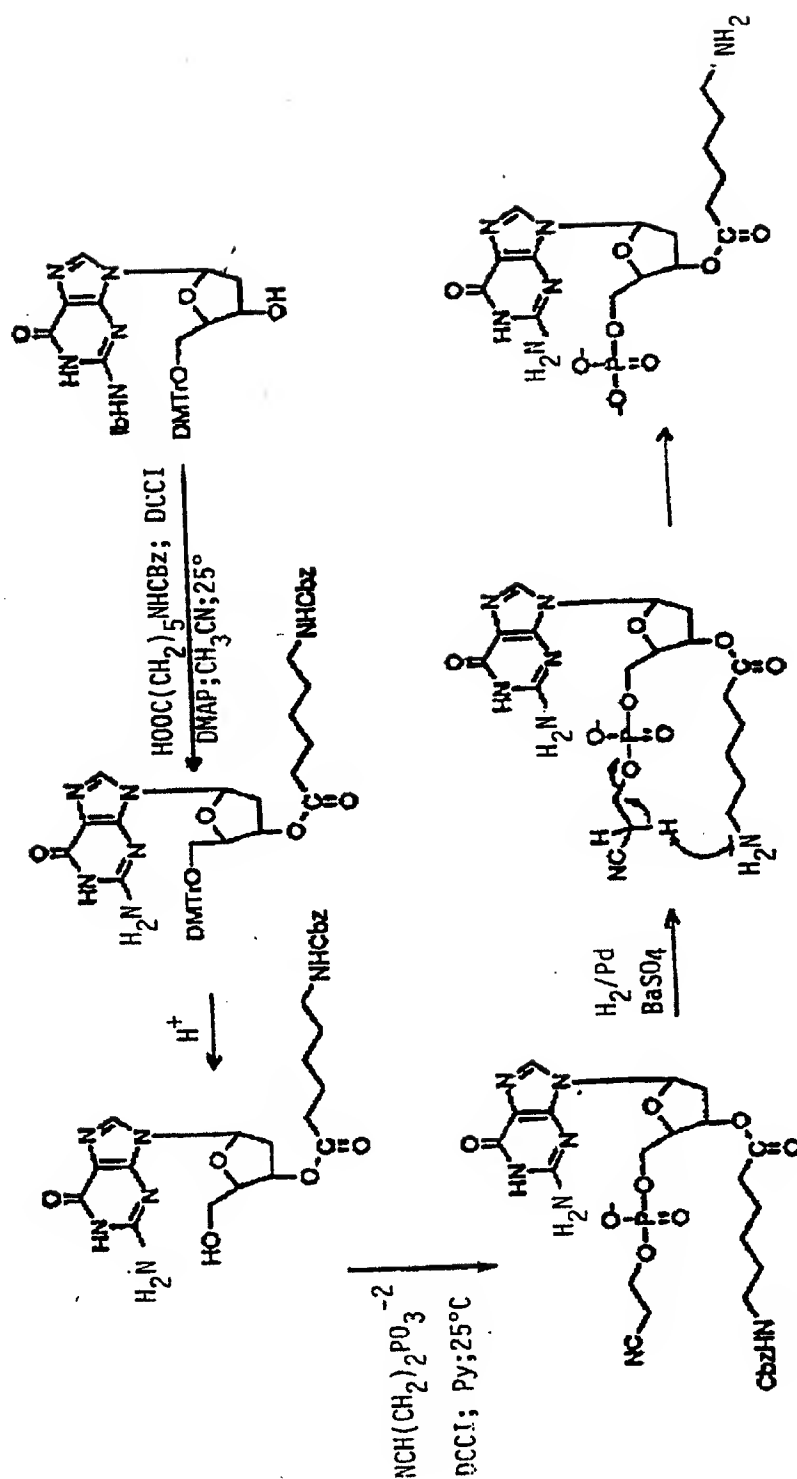


Figure 11 suite A



15/15

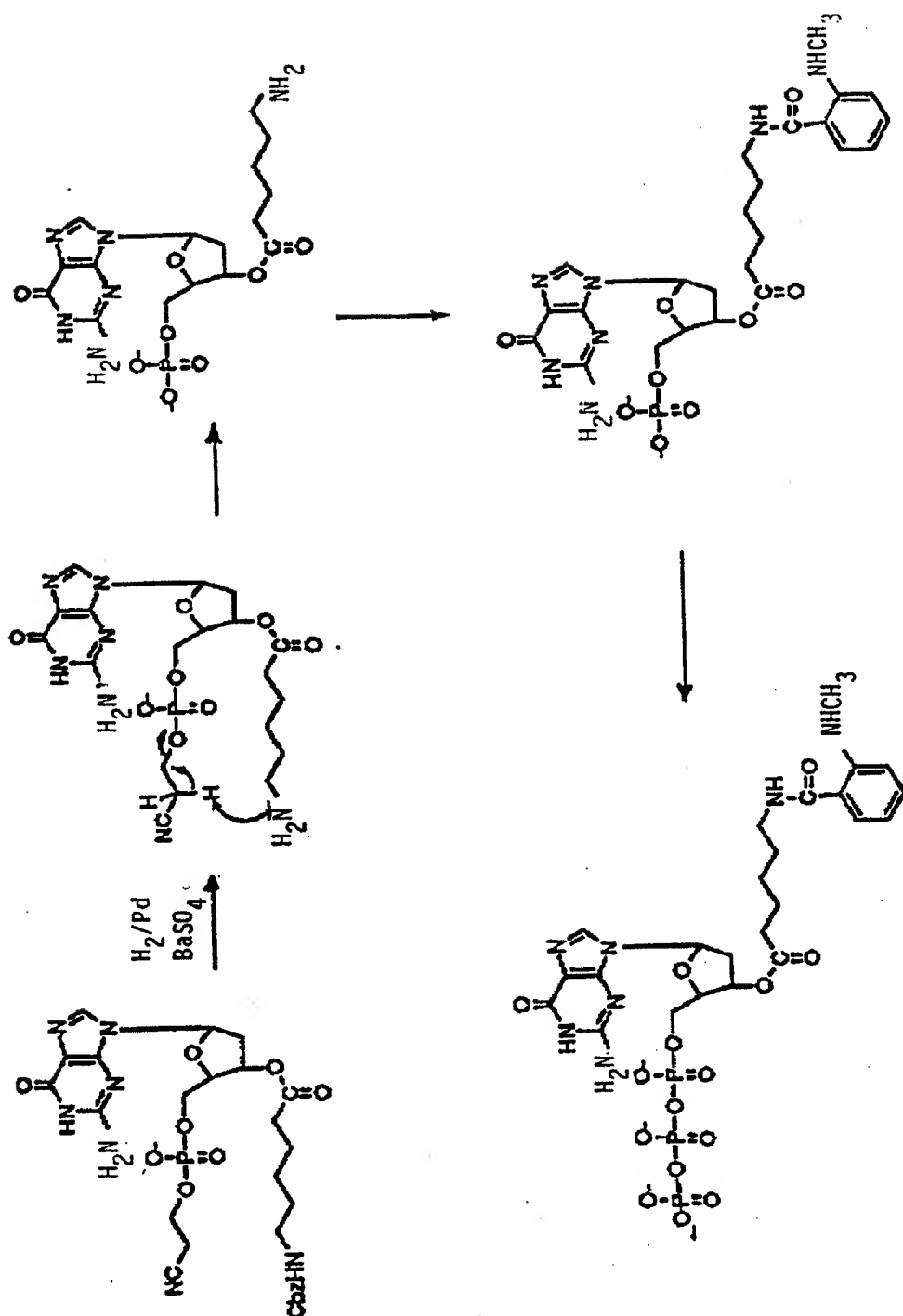


Figure 11 suite B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/00345

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 5 C12Q1/68 C07H19/10 C07H19/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 265, no. 31, 1990, BALTIMORE US pages 18902 - 18906 R. SARFATI ET AL. 'Binding of 3'antraniloyl-2-deoxy-ATP to calmodium activated adenylate cyclase from Bordetella pertussis and Bacillus anthracis' cited in the application	1,2
Y	see abstract; figure 2 ---	5-9
X	WO,A,91 06678 (SRI INT.) 16 May 1991 cited in the application	10
Y	see claims; figure 8 ---	5-9
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 July 1994

Date of mailing of the international search report

14. 07. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina Galan, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 94/00345

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 88, no. 1, 1978, Columbus, Ohio, US; abstract no. 2354j, R. GUILLORY ET AL. page 2354 ;column 1 ; see abstract & METHODS IN ENZYMOLOGY vol. 46 , 1977 , NEW YORK US pages 259 - 288 & CHEMICAL ABSTRACT FORMULA INDEX vol. 10F8 page 14145F Formula C22H29N10O16P3: *Adenosine 5'-(tetrahydrogen triphosphate) 3'-[6-[(4- azido-2-nitrophenyl)amino]hexanoate]* -----	3
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 75, no. 15, 1971, Columbus, Ohio, US; abstract no. 98793g, TARUSOVA ET AL. page 337 ;column 1 ; see abstract & IZV. AKAD. NAUK SSSR, SER. KHIM vol. 7 , 1971 pages 1511 - 1516 & CHEMICAL ABSTRACT FORMULA INDEX vol. 8 page 6397F Formula C16H25N6O7P: *Adenosine 2'deoxy-,3'-(6-aminohexanoate) 5'(dihydrogen phosphate)* -----	3
A	WO,A,93 05183 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 18 March 1993 see the whole document -----	5-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00345

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9106678	16-05-91	EP-A- 0450060	09-10-91
WO-A-9305183	18-03-93	AU-A- 2674092	05-04-93

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 5 C12Q1/68 C07H19/10 C07H19/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 265, no. 31, 1990, BALTIMORE US pages 18902 - 18906 R. SARFATI ET AL. 'Binding of 3'antraniloyl-2-deoxy-ATP to calmodium activated adenylate cyclase from Bordetella pertussis and Bacillus anthracis' cité dans la demande	1,2
Y	voir abrégé; figure 2	5-9
X	WO,A,91 06678 (SRI INT.) 16 Mai 1991 cité dans la demande	10
Y	voir revendications; figure 8	5-9
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 Juillet 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14. 07. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Molina Galan, E

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 88, no. 1, 1978, Columbus, Ohio, US; abstract no. 2354j, R. GUILLORY ET AL. page 2354 ;colonne 1 ; voir abrégé &amp; METHODS IN ENZYMOLOGY vol. 46 , 1977 , NEW YORK US pages 259 - 288 &amp; CHEMICAL ABSTRACT FORMULA INDEX vol. 10F8 page 14145F Formula C22H29N10O16P3: *Adenosine 5'-(tetrahydrogen triphosphate) 3'-[6-[(4- azido-2-nitrophenyl)amino]hexanoate]* ---</p>	3
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 75, no. 15, 1971, Columbus, Ohio, US; abstract no. 98793g, TARUSOVA ET AL. page 337 ;colonne 1 ; voir abrégé &amp; IZV. AKAD. NAUK SSSR, SER. KHIM vol. 7 , 1971 pages 1511 - 1516 &amp; CHEMICAL ABSTRACT FORMULA INDEX vol. 8 page 6397F Formula C16H25N6O7P: *Adenosine 2'deoxy-,3'-(6-amino)hexanoate) 5'(dihydrogen phosphate)* ---</p>	3
A	<p>WO,A,93 05183 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 18 Mars 1993 voir le document en entier -----</p>	5-10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Donnée Internationale No

PCT/FR 94/00345

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9106678	16-05-91	EP-A- 0450060	09-10-91
WO-A-9305183	18-03-93	AU-A- 2674092	05-04-93

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>5</sup> :</b> <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 93/05183</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 18 March 1993 (18.03.93)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US92/07678 <b>(22) International Filing Date:</b> 9 September 1992 (09.09.92) <b>(30) Priority data:</b> 756,645 9 September 1991 (09.09.91) US <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE [US/US]; One Baylor Plaza, Houston, TX 77030-3498 (US). <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only) :</b> GIBBS, Richard [AU/US]; 3602 Gramercy, Houston, TX 77025 (US). RICHARDS, Stephen [GB/US]; 1937 Dryden, Apt. #3, Houston, TX 77030 (US). CIVITELLO, Andrew [US/US]; 2601 South Braeswood, #602, Houston, TX 77025 (US). BURGESS, Kevin [US/US]; 1713 B. Lawyer Street, College Station, TX 77840 (US). RAGHAVACHARI, Ramesh [US/US]; 4302 College Main, Apt. #119, Bryan, TX 77801-4014 (US). METZKER, Michael, L. [US/US]; 7315 Brompton, Apt. #366B, Houston, TX 77025 (US).		<b>(74) Agent:</b> Paul, Thomas, D.; Fulbright & Jaworski, 1301 McKinney, Suite 5100, Houston, TX 77010-3095 (US). <b>(81) Designated States:</b> AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD AND DEVICE FOR RAPID DNA OR RNA SEQUENCING DETERMINATION BY A BASE ADDITION SEQUENCING SCHEME		
<b>(57) Abstract</b>  A multiple base addition sequencing scheme (BASS) for the rapid sequencing of oligonucleotides (DNA and RNA) involving the steps of attaching a plurality of DNA or RNA strands to be sequenced to a coated support, adding a modified nucleotide, detecting the modified nucleotide, removing the blocking group and repeating the steps until the RNA or DNA is sequenced. Methods for improving and monitoring coupling efficiency are included. Two separate methods of automation using BASS are described. The first includes buffer reservoirs, two controllable valves, a detector and a plurality of reaction columns. The second includes a solid support, a plurality of buffer reservoirs, a detector means, a computer means and a movement means. Also described is a device for simultaneously sequencing a plurality of RNA or DNA sequences.		



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FI	Finland	MN	Mongolia
AU	Australia	FR	France	MR	Mauritania
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgium	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norway
BG	Bulgaria	GR	Greece	NZ	New Zealand
BJ	Benin	HU	Hungary	PL	Poland
BR	Brazil	IE	Ireland	PT	Portugal
CA	Canada	IT	Italy	RO	Romania
CF	Central African Republic	JP	Japan	RU	Russian Federation
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovak Republic
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	SU	Soviet Union
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TD	Chad
DE	Germany	MG	Madagascar	TG	Togo
DK	Denmark	ML	Mali	UA	Ukraine
ES	Spain			US	United States of America

-1-

METHOD AND DEVICE FOR RAPID DNA OR RNA SEQUENCING  
DETERMINATION BY A BASE ADDITION  
SEQUENCING SCHEME

Field of the Invention

5        This invention relates to the field of rapid sequencing of oligonucleotides by the base addition method. More particularly, this invention relates to a method for determining DNA and RNA sequences without gel electrophoresis, utilizing different leaving and reporting groups attached to the 3'-hydroxyl position of the nucleotides.

10

Background

      The analysis of primary DNA sequence is an important process for all kinds of biological studies. Two general approaches have been favored for DNA sequencing in the last ten years. These are the Maxam-Gilbert method of modification of specific DNA bases followed by chemical  
15        degradation at the modified sites, and the Sanger dideoxy termination method. These approaches have the common feature that a population of DNA molecules of different sizes is generated by the sequencing procedure, and therefore gel electrophoresis is required in order to resolve the sequencing products and to complete the analysis.

20

      There have been several attempts to speed up and simplify the DNA sequencing procedures. Improvements include: (1) using fluorescent labels in place of radioisotopes, (2) "multiplex" mixing of different molecules prior to sequencing reactions followed by transfer of the sequencing gels to a membrane and hybridization with a specific probe to identify each  
25        element, (3) using mass spectrometry to detect the different bases, (4) using solid supports to entrap the DNA or RNA template, or (5) using different stable isotopes to detect bases. All of these modified procedures rely on the previously described Sanger or Maxam-Gilbert approaches, and therefore, have the component of gel electrophoresis.

-2-

Another approach which is different includes DNA sequencing by the hybridization approach. This approach relies on specific hybridization of short oligonucleotides to sequences bound to a solid support. In this method either the DNA to be sequenced or the numerous necessary oligonucleotide probes must be fixed to a solid support and repeated hybridizations carried out. This method is unproven and differs both in concept and design to the Base Addition Sequencing Scheme of the present invention.

An additional method which has been described measures the release of a group from each base as it is joined to a growing oligonucleotide. For example, inorganic phosphate is released from the 5'-terminus of a specific deoxyribonucleotide triphosphate and is detected as a substrate for the enzyme luciferase.

A further procedure that aims to speed up sequence analysis is a method that uses enzymatic degradation of single stranded DNA molecules in an apparatus that has a rapid flow of reagents past a template molecule fixed on a solid support.

The present invention provides a novel approach for DNA sequencing comprising repetitive cycles of enzyme catalyzed incorporation of nucleotides into a DNA template primer complex. The nucleotides are added at the first available position and are blocked from further extension at the 3'-hydroxyl terminus by a chemical group. Each cycle of addition is followed by chemical release of a blocking group and addition of the next base. The detection of the blocking group either in situ or after leaving reveals the DNA sequence.

#### Summary of the Invention

An object of the present invention is a rapid assay for sequencing oligonucleotides of DNA and RNA, an aspect of which is to accomplish oligonucleotide sequencing without gel electrophoresis.

-3-

An additional object of the present invention is a multiplex DNA and RNA sequencing method.

5 A further object of the present invention is methods of automation for rapid sequencing of a plurality of DNA or RNA molecules by a base addition sequencing scheme.

A further object of the present invention is a device for rapid sequencing of a plurality of DNA or RNA molecules by a base addition sequencing scheme.

10 Thus, in accomplishing the foregoing objects, there is provide in accordance with one aspect of the present invention a multiplex assay for determining the sequence of a strand of DNA or RNA, comprising the steps of attaching a plurality of DNA or RNA templates with annealed primers to a solid support; contacting the attached DNA or RNA templates with a reaction buffer, said buffer containing modified  
15 nucleotides and an enzyme to attach the modified nucleotides to the 3'-hydroxyl terminus of the primer attached to each template, wherein the modified nucleotides include a blocking group and a reporter, wherein the blocking group blocks the addition of further nucleotides to the primer and the reporter identifies which nucleotide has attached to the primer;  
20 removing the unreacted modified nucleotides by washing the reacted DNA or RNA with a first wash buffer; detecting the attached modified nucleotide added to each primer; removing the blocking group and reporter by contacting the DNA or RNA with a detaching buffer; washing the attached DNA or RNA with a second wash buffer to remove traces of  
25 the detaching buffer and repeating the above steps until the DNA or RNA has been sequenced.

30 In specific embodiments of the present invention, the solid support is selected from the group consisting of a Streptavidin/biotin coated surface, a derivatized photoactivatable glass, and a  $\text{NH}_2$  binding group attached to glass.

-4-

Another aspect of the present invention is devices for simultaneously sequencing a plurality of DNA or RNA sequences. A first device comprises: a first reservoir for a detaching buffer; a second reservoir for a reaction buffer; a third reservoir for a washing buffer; a plurality of columns, each column including a solid support for attaching a DNA or RNA template with attached primers; a detector means; a fourth reservoir for a capping buffer; and a fifth reservoir for waste; said first, through fourth reservoirs being connected to the entrance ends of said columns through a first controllable valve to supply the appropriate buffer to said columns; said detector means, fifth reservoir and second reservoir being connected to the exit end of said columns through a second controllable valve to direct the outflow of the columns flow through the detector and into the waste reservoir and to recycle the reaction buffer.

A second device comprises: a solid support for attaching the plurality of DNA or RNA templates with annealed primers at discrete locations; a plurality of buffer reservoirs for holding reaction buffer, wash buffers, capping buffer and detaching buffer; and a detector means for identifying the addition of a nucleotide to the annealed primers; wherein said solid support, buffer reservoirs and detector means are relationally positioned on a movement means such that there are repeated cycles of the solid support with attached DNA or RNA sequentially contacting the reaction buffer to add a modified nucleotide to the primers, the first wash buffer to remove unreacted nucleotides, a capping buffer to prevent further elongation of unreacted template primers, the detector means to identify which nucleotide was added to each primer, the detaching buffer for removing a blocking group and reporter from the attached modified nucleotide, and the second wash buffer to remove traces of the detaching buffer.

-5-

Both devices can be automated by attaching them to a computer means for controlling the sequencing steps and recording the image from the detector means.

Other and further objects, features and advantages will be apparent and eventually more readily understood from a reading of the following specification and by reference to the accompanying drawings forming a part thereof where examples of the presently preferred embodiments of the invention are given for the purpose of disclosure.

#### Description of the Drawings

Figure 1 is a schematic representation showing four modified nucleotides which can be used in the present invention. Figure 1A shows adenosine 5' triphosphate with Leaving Group "A"; 1B shows guanosine 5' triphosphate with Leaving Group "G"; 1C shows cytosine 5' triphosphate with Leaving Group "C"; and 1D shows thymine 5' triphosphate with Leaving Group "T".

Figures 2A, 2B and 2C are a serial schematic representation showing a base addition sequence scheme for a single DNA template attached to a solid support with a flow through detector.

Figure 3 is a schematic diagram for the base addition sequence scheme of multiple templates bound to solid supports with flow through detectors.

Figures 4A, 4B and 4C are a serial schematic representation of a base addition sequence scheme analysis of a single DNA template attached to a solid support with in situ detection.

Figure 5 is a schematic of a device for base addition sequence scheme analysis.

Figure 6 is a diagram of a multiplex template support for the base addition sequence scheme analysis of multiple DNA templates with in situ detection.

-6-

Figure 7 shows a purine base (adenosine) with a photolabile blocking group at the 3'-terminus.

The drawings and figures are not necessarily the scale and certain features may be exaggerated in scale or shown in schematic form in the interest of clarity and conciseness.

#### Detailed description of the invention

It will be readily apparent to one skilled in the art that various substitutions and modifications may be made to the inventions disclosed herein without departing from the scope and the spirit of the invention.

10 The term "modified nucleotide" as used herein is defined as a nucleotide which has a chemical group attached to the nucleotide. This chemical group blocks the addition of further nucleotides through the 3'-hydroxyl group of the modified nucleotide. Thus a modified nucleotide, once attached to a primer, prevents further elongation through the 3'-hydroxyl group of the sequence unless the blocking group is removed.

15 The term "blocking group" and "blocker" as used herein is defined as any chemical group which can be attached to a DNA or RNA nucleotide and which will allow the 5' end of the modified nucleotide to attach to a 3' end of another nucleotide but will not allow attachment of a nucleotide to the 3'-hydroxyl group of the modified nucleotide. The blocking group can attach directly to the 3'-hydroxyl group (protection group) or attach to another part of the nucleotide and prevent reaction with the 3'-hydroxyl group for example by steric hinderance. The blocking group's chemical structure can also include a reporter or marker moiety.

20 The terms "reporter" or "marker" as used herein are defined as any element or molecule moiety which can be attached to the nucleotide and which can be used to detect and identify specific nucleotides. Some specific examples of reporters or markers include metal ions, fluorescent dyes, radioisotopes, antibodies and chemiluminescence compounds.

-7-

Normally when sequencing DNA or RNA the four different nucleotides, 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxycytidine and 2'-deoxythymidine, are used. Each nucleotide can be identified because a different reporter will be attached to each nucleotide. The reporter can be any combination of the above molecular moieties. For example the reporter could be different fluorescent compounds or different radioisotopes or different metal ions or a mixture of any combination of fluorescent compounds, radioactive compounds, metal ions or antibodies. One skilled in the art will readily recognize that the selection of the combination of reporters depends on the detection means being utilized. Examples of molecules used in the present invention are shown in Figure 1 and Figure 7.

Certain characteristics are important in identifying those groups which are useful for the blocking of the 3'-hydroxyl group. The functional definition of a hydroxyl blocking group includes compounds (i) which react with the 3'-hydroxyl group and prevent further unwanted reactions; (ii) are easily removed; and (iii) upon removal leave the hydroxyl group intact and able to react with the 5' end of another nucleotide. In the present invention various hydroxyl blocking groups are available, including: (i) ethers which are generally removed by acid treatment; (ii) esters which are generally removed by alkali/base treatment; (iii) carbonates; and (iv) sulphonates. Some specific examples of blocking groups include Tetrahydropyranyl ether, 1-ethoxyethyl ether, trimethylsilyl ether, Bis (2-chlorethoxy) methyl ether. Further examples are known in the art and some are shown in "Protective Groups in Organic Synthesis" by Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, New York, 1981. An example of photolabile group can be seen in Ohtsuha, et al., J. Am. Chem. Soc. 100:4210-8213 (1978).

An additional alternative blocking group and means for its detachment is a photolabile blocking group as shown in figure 7. This



modified nucleotide is accepted by the BST polymerase, and terminates further primer elongation after its addition due to the bonding of the blocking of the 3'-hydroxyl terminus. This blocking group can be entirely removed by a 120 second exposure to short wavelength UV light. Since  
5 the UV wavelength required for removal of the labile blocking group is different from the UV wavelength that can damage DNA, narrow bandwidth UV emitters or UV filters can be used to protect the DNA from UV damage.

The blocking groups which can be used are well known by those  
10 skilled in the art. The blocking groups generally are those which can be removed either by base, acid, salt, ions, a combination of salt and ions, or by the bombardment of light. The blocking group and reporter can be combined.

One embodiment of the present invention is the assay for  
15 determining the sequence of a strand of DNA or RNA. This assay is shown schematically in Figures 2 and 4. The assay includes attaching a plurality of DNA or RNA templates 13 with annealed primers 16 to a solid support 10; contacting the attached DNA or RNA templates with a reaction buffer, said buffer containing modified nucleotides and an enzyme  
20 to attach the modified nucleotides to the 3'-hydroxyl terminus of the primer 16 attached to each DNA or RNA, wherein the modified nucleotides include a blocking group and a reporter, wherein the blocking group blocks the addition of further nucleotides to the primer and the reporter identifies which nucleotide has attached to the primer; removing  
25 the unreacted modified nucleotides by contacting the reacted DNA or RNA template with a first wash buffer; detecting the attached modified nucleotide added to each primer; capping any unreacted template; removing the blocking group and reporter by contacting the DNA or RNA with a detaching buffer; contacting the attached DNA or RNA with a

second wash buffer to remove traces of the detaching buffer; and repeating the above steps until the DNA or RNA has been sequenced.

In this method the solid support can be selected from any group of solid supports known to the art to bind DNA or RNA. Some solid supports which are useful in the procedure include strepavidin/biotin coated surfaces, derivatized photoactivatable surfaces and  $\text{NH}_2$  binding groups attached to glass. In the preferred embodiment biotinylated DNA or RNA templates are attached to strepavidin coated supports.

In the present assay each different type of nucleotide which is being added to the RNA or DNA primer has a specific reporter attached. This reporter can be measured while attached to DNA (in situ) or can be cleaved with the blocking group and then measured. In a preferred embodiment of the present invention the reporters are a fluorescent compounds which are measured in situ by activation by laser excitation and recording of the emissions spectra detector.

The reaction buffer is designed to add a modified nucleotide to the primer which has been attached to the DNA or RNA template strand to be sequenced. The reaction buffer will contain the modified nucleotides and an enzyme to attach the modified nucleotides to the 3' hydroxyl terminus of the primer attached to each DNA or RNA template. One skilled in the art will recognize that a variety of buffers can be used. In the preferred embodiment the buffer is 25mM Tris pH 7.8, 50mM NaCl, 10mM  $\text{MgCl}_2$ . The enzymes used to attach the modified nucleotide to the primer strand for the sequence analysis can include any of the following T7, Taq, Klenow,  $T_4$ , Pol 1, DNA polymerase and reverse transcriptase.

A further aspect of this embodiment is a method to remove unblocked (unmodified) nucleotides which may contaminate the reaction buffer. A source of this contamination comes from a very small percentage of the modified nucleotides having the labile modifying (blocking) group spontaneously detach under normal condition, leaving an

-10-

unblocked nucleotide. To remove any contaminating unblocked nucleotides, a scavenger reaction may be included in the reaction buffer.

5 In one embodiment, decontamination may be accomplished by including in the reaction buffer, nucleotide specific scavenger primer-template complexes and any additional necessary enzyme to incorporate unblocked nucleotides present into the scavenger complexes. The scavenger complexes bond any unblocked nucleotides, and because the complexes are not attached to the solid support, the contaminating nucleotides are removed along with the complexes in the following  
10 washing step. Pretreatment of the reaction buffer can be performed either with the same enzyme(s) being used to add the modified nucleotides, or by other additional enzyme(s). For example, terminal transferase may be used as an additional enzyme.

15 The wash buffers used in the present invention can be of a variety of different types. When removing unreacted modified nucleotides the wash buffer is usually 25mM Tris pH 7.8; 20mM NaCl. The same wash buffer can be used to remove traces of the detaching buffer.

An additional aspect of this embodiment is a method for "capping" unreacted 3'-hydroxyl termini of the primed templates on the  
20 solid support. Failure to couple a modified nucleotide to a primed template during contact with the reaction buffer results in that template's primer elongating out of sync with the rest of the template primers for the remainder of the sequencing procedure. This out of sync elongation causes a loss of fidelity of the signal from that particular template position  
25 and an overall loss of sensitivity.

To prevent unreacted template primers on the solid support from further elongation, a capping step may be incorporated into the assay cycle. Such a step may be inserted in the cycle after the addition of the modified nucleotides, but before the removal of blocking groups. The  
30 capping step comprises contacting the solid support with a capping buffer.

-11-

A capping buffer comprises an appropriate buffer containing a free molecular blocker (capping agent) and the necessary reagents under conditions to stably bond the molecular blocker (capping agent) to the template primer, and prevent further primer elongation. A capping agent may consist of stably blocked nucleotides or dideoxynucleotides.

5 An advantage of the capping step is its utility in monitoring the overall coupling efficiency of the BASS process. To monitor overall coupling efficiency of the sequencing process, the capping reagent can also contain a non-labile marker moiety. As an element of the capping reagent, 10 this marker remains on the on the template primer throughout subsequent sequencing cycles. By detecting and monitoring the presence and accumulation of capped template primers, the overall efficiency of the sequencing procedure can be monitored. Such information is useful for overall reagent economy, for adjusting reagent and reaction parameters 15 (e.g., concentrations, time, temperatures) for optimizing the sequencing procedure at every cycle, for determining the maximum number of repeat cycles a for a given sequencing procedure. A further particular advantage is that a capping reagent marker is an aspect of the present invention that embodies great utility in the automation of the BASS method. The 20 presence and accumulation of the capping agent marker may be monitored in situ by a detector connected to automated control means, such as a computer. The signal from the capping agent marker via the detector can be used to determine the overall coupling efficiency, and provide the signal to a computer, for example, which can adjust the metering of reagents, 25 reaction times and temperature to optimize overall BASS performance, as well as to terminate drastically failed sequencing procedure.

The detaching buffer is used to remove the blocking group and reporter from the modified nucleotide so that the next nucleotide can be added. Detaching buffers are well known in the art and depend on which

-12-

blocking group is being used. Examples of detaching buffers are given in "Protective Groups in Organic Synthesis" by Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, New York, 1981. In using the detaching buffer one skilled in the art will readily recognize that, under the optimum conditions, the  
5 buffer must not be too strong of an acid or base so that the enzymes necessary to extend the chain are not destroyed or that the nucleotides are not hydrolyzed or altered. Further, too much base or heat will cause the strands to melt apart. Additionally, the enzyme is greatly affected by both salt and pH. On the other hand, if the conditions affect the enzyme, more  
10 enzymes can be easily added to replenish the damaged enzyme.

When laser excitation is used to detach the blocking group, the laser  
25 can be directed at the molecule and cause the detachment. An example of this is linkage to the nucleoside by a photolabile o-nitrobenzyl ether. Not only can the laser procedure be used to remove the blocking group but  
15 it can also be used to activate the reporter and thus measurement of which nucleotide was attached. In one embodiment of the invention the laser excitation method is used because it provides easier automation and decreases the number of reporters required.

Another embodiment of the present invention is the device 52  
20 shown in Figure 3. The device 52 can be used for simultaneously sequencing a plurality of DNA or RNA sequences and comprises a first reservoir 34 for detaching buffer, a second reservoir 37 for a reaction buffer, a third reservoir 31 for a washing buffer, a plurality of columns 12, each column 12 including a solid support 10 for attaching a DNA or RNA  
25 template with attached primer. There is also included a detector means 22 and a fourth reservoir 40 for waste. In this device the first 34, the second 37 and the third 31 reservoirs are connected to the entrance ends of the columns 12 through a first controllable valve 43 to supply the appropriate buffer to said columns 12. The detector means 22, the fourth  
30 reservoir 40 and the second reservoir 37 are connected to the exit end of

-13-

the columns 12 through a second controllable valve 46 to direct the flow through the columns 12 through the detector 22 and into the waste reservoir 40 or to recycle the reaction buffer into the reservoir 37. In enhanced embodiments of this device there is also a computer means (not shown) which can be attached to the device. The computer means regulates the sequencing procedure. It can control the first 43 and second 46 controllable valves. Further, it can record the output from the detector means 22, and be used for storage and output. One skilled in the art readily recognizes that a variety of controller boards and personal computers can be used as the computer means.

An alternate device 49 for simultaneously sequencing a plurality of DNA and RNA strands 13 is shown in Figure 5. This device 49 comprises a solid support 10 for attaching the plurality of DNA or RNA templates 13 with annealed primers 16 at discreet locations. An example of a solid support 10 with discreet locations 55 is schematically shown in Figure 6. In Figure 5 a plurality of buffer reservoirs 31, 32, 34 and 37 for holding wash buffers A & B, detaching buffer and reaction buffer, can be seen. Further a detector means 22 for identifying the addition of a nucleotide to the annealed primers is also shown. In the device 49 the solid support 10, buffer reservoirs 31, 32, 34 and 37, and detector means 22 are relationally positioned on a movement means such that there are repeated cycles of the solid support 10 sequentially contacting the (i) reaction buffer to add a modified nucleotide to the primers, (ii) the first wash buffer to remove unreacted nucleotides, (iii) the detector means to identify which nucleotide was added to each primer, (iv) the detaching buffer for removing a blocking group and reporter from the attached modified nucleotide, and (v) the second wash buffer to remove traces of the detaching buffer. One skilled in the art will readily recognize that the first and second wash buffer could be identical and thus only one wash buffer reservoir would be needed. The device 49 schematically shown in

-14-

Figure 5 can also further comprise a computer means for automating and regulating the number of repeated cycles and the sequential movement of the support 10, reservoirs 31, 32, 34 and 37, and detector 22. Additionally, the computer means can be attached to the detector 22 in order to record the output of the detector means. This output can then be stored for further use or manipulated and output into more easily readable reports. Additionally the whole device can be incorporated into a cabinet.

In the preferred embodiment of the devices 49 and 52, the solid support is avidin coated glass plates. The biotinylated DNA can then be attached to the avidin surface. The primers can be attached to the DNA prior to attachment to the solid support or can be added after attachment.

In the preferred embodiment of the invention the detector means includes a laser for excitation of the fluorescent reporter groups and a camera and a computer for digitation. One skilled in the art will readily recognize that a variety of detectors are available. Examples include charge coupled device (CCD) camera, video camera with filter, fluorescent microscopes, regular photo multiplier and photographs. The selection of the detector will depend on the reporter used. A fluorescent dye, radioisotope, chemiluminescent compound, antibody, or other reporter/marker can be used. A variety of such devices are available commercially. In the present means the detection means is selected depending on which marker or reporter is used.

The following examples are offered by way of illustration are not intended to limit the invention in any manner.

#### Example 1

#### Base Addition Sequencing Scheme (BASS) Analysis of DNA Templates Attached to Solid Supports With a Flow Through Director

-15-

The following procedure shows BASS analysis of a single DNA template attached to a solid support. The DNA template is initially bound to a solid support, with a short primer strand concurrently or subsequently annealed to it. This combination is then contacted with the four modified nucleotides and enzyme in the appropriate buffer (25mM Tris, pH 7.8, 50mM NaCl 10mM MgCl, 5-50 units DNA polymerase). Then the primer is enzymatically extended by one base (at 37°C or 50°C for about 2 to 30 mins.). The 3' leaving group (LG) of the modified nucleotide blocks further extension, and Watson - Crick base pairing ensures that only the correct nucleotide is added. Then unreacted nucleotides are washed away. Then the leaving group, which may be a fluorescent moiety with an acid-labile linker, is removed by an acid wash. The 3' end of the nucleotide is now ready for the addition of another modified nucleotide. The leaving group is eluted to a fluorescence detector which can distinguish between the reporter groups, and the reporter is detected.

This scheme makes use of established techniques for the attachment of a single DNA strand (template) to a strepavidin coated solid support via a biotin group at the 3' (or 5') terminus. In figure 2A, the oligonucleotide template is already bound to an oligonucleotide primer. The sequencing begins by mixing the DNA template/primer complex with the four modified nucleotides and the DNA polymerase in an appropriate buffer. One of the four nucleotides will be added to complement the next base in the sequence. In the figure 2B, the modified nucleotide 19 is LG:A (i.e., a modified dATP) which complements the first 'T' in the template sequence. Once the a base is added no further elongation of the primer can occur that cycle due to the presence of the blocking group attached at the 3' terminus.

After the unreacted nucleotides are washed away, in figure 2C the DNA template/primer complex is treated with mild acid to cause the group



-16-

blocking the 3' hydroxyl terminus of the primed site to leave, restoring an active 3' hydroxyl site. A fluorescence detector identifies the group as it leaves the column and therefore indicates the previous addition of the modified 'A' nucleotide at the first site in the sequence. The process is repeated with a new base added each time, and the fluorescent detection of a new leaving moiety each cycle. The accumulated record of the different fluorescent groups leaving the column after each cycle represents the DNA sequence of the template strand. It should be noted that a simple way to 'multiplex' the procedure is by having multiple columns with different templates in parallel.

### Example 2

#### BASS Analysis of a DNA Template Bound

#### To Solid Supports With *In Situ* Detection

BASS analysis of a DNA sequence can also be done with in situ detection of the added bases. The scheme is very similar to that described in Example 1 above. A DNA template is bound to a solid support and a short primer strand annealed to it. This combination is then contacted with the four modified nucleotides and enzyme in the appropriate buffer (see conditions Example 1). Then the primer is enzymatically extended by one base (see conditions Example 1). The 3' leaving group (LG) blocks further extension, and Watson - Crick base pairing ensures that only the correct nucleotide is added. Unreacted nucleotides are washed away. A capping step may be performed now or after the following step. The fluorescent reporter is detected by the detector means while still in place on the template. In this procedure the reporter is excited by an argon laser and the emission spectra is recorded by a fluorescence detector. The detector can distinguish between the reporter groups. Then the leaving group is cleaved with mild acid and eluted off the column, restoring the 3' terminal hydroxyl, and therefore allowing further nucleotide additions.

-17-

To facilitate the in situ detection the oligonucleotide (DNA or RNA) can be fixed to a glass plate as a solid support. This greatly facilitates 'multiplex' analysis of DNA templates since an array of different DNAs can be attached to a single glass plate and all the samples treated in parallel. With currently available fluorescent imaging software and hardware very large numbers of DNA templates are attached to single plates. Thus, thousands of sequences are determined in a single BASS run.

### Example 3

10

#### Application of BASS

BASS is applicable to any situation where other DNA sequence methods can be used. These include:

- (a) The analysis of different genes and genomes. The sequencing of the human genome is possible with this method.
- 15 (b) The identification and characterization of different organisms.
- (c) The diagnosis of genetic diseases and cancers.

BASS also has several advantages over previous sequencing schemes. These include:

- 20 (a) Obviating the gel electrophoresis required for other methods, so that size resolution of different fragments does not limit the extent of the sequence that can be obtained in a single analysis,
- (b) More signal from each base addition in the scheme is generated than by other methods, since at any one step in the analysis all the DNA templates will be labelled only with a single base. In the Sanger sequencing scheme, for example, all the signal is distributed over all the bases to be analyzed,
- 25 (c) BASS is very easily and economically multiplexed so that thousands of DNA templates are simultaneously analyzed with a reduction in cost and effort relative to current methods.
- 30 (d) less secondary structural problems.

-18-

All publications mentioned in this specification are indicative of the skill level of those skilled in the art to which the invention pertains. All publications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

5

One skilled in the art will readily appreciate the present invention is well adapted to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned as well as those inherent therein. The devices, compounds, assays, methods, procedures and techniques described herein are presently representative of the preferred embodiments and are intended to be exemplary and are not intended as limitations of the scope. Changes therein and other uses will occur to those skilled in the art which are encompassed within the spirit of the invention or defined by the scope of the appended claims.

10

15

What is claimed is:

-19-

CLAIMS

1. A multiplex assay for determining the sequence of a strand of DNA or RNA, comprising the steps of:

attaching a plurality of DNA or RNA templates with  
annealed primers to a solid support;

contacting the attached DNA or RNA templates with  
a reaction buffer, said buffer containing modified nucleotides  
and an enzyme to attach the modified nucleotides to the 3'-  
hydroxyl terminus of the primer attached to each DNA or  
RNA, wherein the modified nucleotides include a blocking  
group and a reporter, wherein the blocking group blocks the  
addition of further nucleotides to the primer and the  
reporter identifies which nucleotide has attached to the  
primer;

removing unreacted modified nucleotides by washing  
said solid support with a first wash buffer;

detecting the attached modified nucleotide added to  
each primer;

removing the blocking group and reporter by  
contacting the DNA or RNA with a detaching buffer;

contacting the attached DNA or RNA with a second  
wash buffer to remove traces of the detaching buffer; and

repeating the above steps until the DNA or RNA has  
been sequenced.

2. The assay of claim 1, wherein the solid support is selected  
from the group consisting of a Streptavidin/biotin coated surface, a  
derivatized photoactivatable glass support and a  $\text{NH}_2$  binding group  
attached to glass.

3. The assay of claim 1 wherein the solid support is an avidin  
coated support;

-20-

4. The assay of claim 1, wherein the modified nucleotide includes a reporter selected from the group consisting of metal ions, fluorescent dyes, radioisotopes, antibodies and chemiluminescence compounds.

5 5. The assay of claim 1, wherein the reporter is a fluorescent dye.

6. The assay of claim 4, wherein each different nucleotide which can be added to the primer has a different reporter.

10 7. The assay of claim 1, wherein the detecting step includes excitation by laser and recording of the emission spectra.

8. The assay of claim 1, wherein the detection is by laser excitation and CCD camera digitization.

9. The assay of claim 1, wherein the blocking group and reporter are removed prior to the detecting step.

15 10. The assay of claim 1, wherein the enzyme is selected from the group consisting of T7, Taq, Klenow, T<sub>4</sub>, Pol 1, DNA polymerase and reverse transcriptase.

20 11. The assay of claim 1, wherein the modified nucleotides are 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxycytidine and 2'-deoxythymidine, each with a blocking group and reporter attached to the 3'-OH group of said modified nucleotide.

12. A device for simultaneously sequencing a plurality of DNA or RNA sequences, comprising:

- 25 a first reservoir for a detaching buffer;  
a second reservoir for a reaction buffer;  
a third reservoir for a washing buffer;  
a plurality of columns, each column including a solid support  
for attaching a DNA or RNA template with attached primers;  
a detector means; and  
30 a fourth reservoir for waste;

-21-

said first, second and third reservoirs being connected to an entrance end of said columns through a first controllable valve to supply an appropriate buffer at appropriate time to said columns;

5        said detector means, fourth reservoir and second reservoir being connected to an exit end of said columns through a second controllable valve to direct column flow through said detector and into said waste reservoir and to recycle said reaction buffer.

10        13.    The device of claim 12, further comprising a computer means attached to said device for regulating the controllable valves and for recording the output from the detecting means.

14.    A device for simultaneously sequencing a plurality of DNA or RNA strands, comprising:

15        a solid support for attaching the plurality of DNA or RNA templates with annealed primers at discrete locations;

16        a plurality of buffer reservoirs for holding reaction buffer, wash buffer and detaching buffer;

17        a detector means for identifying addition of a nucleotide to the annealed primers; and

20        a movement means, wherein said solid support, buffer reservoirs and detector means are relationally positioned on said movement means such that there are repeated cycles of the solid support with attached DNA or RNA sequentially contacting the reaction buffer to add a modified nucleotide to the primers, a first wash buffer to remove unreacted nucleotides, the detector means  
25        to identify which nucleotide was added to each primer, a detaching buffer for removing a blocking group and reporter from the attached modified nucleotide, and a second wash buffer to remove traces of said detaching buffer.

-22-

15. The device of claim 14, further comprising a computer means for automating and regulating the number of repeat cycles and the sequential movement, of the support, reservoirs and detector.

5 16. The device of claim 14, further comprising a computer means for recording the output of the detector means.

17. The device of claim 14, wherein the solid support is an avidin coated glass plate.

18. The device of claim 14, wherein the detector means includes a laser for excitation and CCD camera for digitization.

10 19. The device of claim 14, wherein the first and second wash buffer reservoirs are combined to form a single reservoir.

20. The device of claim 14, further including a cabinet to hold the device.

15 21. A device for the automated sequencing of a plurality of DNA or RNA strands, comprising:

a solid support for attaching the plurality of DNA or RNA templates with annealed primers at discreet locations;

a plurality of buffer reservoirs for holding reaction buffer, wash buffer and detaching buffer;

20 a detector means for identifying addition of a nucleotide to the annealed primers;

25 a movement means, wherein said solid support, buffer reservoirs and detector means are relationally positioned on said movement means such that there are repeated cycles of the solid support with attached DNA or RNA sequentially contacting the reaction buffer to add a modified nucleotide to the primers, a first wash buffer to remove unreacted nucleotides, the detector means to identify which nucleotide was added to each primer, a detaching buffer for removing a blocking group and reporter from the

-23-

attached modified nucleotide and a second wash buffer to remove traces of the detaching buffer; and

5 a computer means, wherein the computer means is connected to said movement means to regulate the number of repeated cycles and the sequential movement, and the computer means is attached to the detector means to record the output.

22. The device of claim 21, further including a cabinet for holding all the elements together.

10 23. The device of claim 21, wherein the first and second wash buffer reservoirs are combined to form a single reservoir.

24. A method for determining the sequence of an oligonucleotide template comprising the steps of:

15 attaching a primed template to a solid support;  
contacting said primed template with a reaction buffer containing a modified nucleotides, and an enzyme to add one of said modified nucleotide to a 3'-hydroxyl terminus of said primer of said primed template, wherein said modified nucleotides include a blocking group and a reporter;

20 adding one of said modified nucleotides to said 3'-hydroxyl terminus;

washing said primed template with a first wash buffer;  
removing said blocking group and reporter from said added modified nucleotide by contacting said primed template with a detaching buffer;

25 detecting said reporter in said detaching buffer after removing said reporter from said added modified nucleotide;

washing said primed template with a second wash buffer;  
and

30 repeating above said steps until said oligonucleotide template is sequenced.



-24-

25. The method of claim 24, wherein an oligonucleotide template is attached to said solid support in said attaching step, and a primer is annealed to said template to form a primed template;

5 26. The method of claim 24, further comprising a decontaminating step practiced concurrent with or immediately after said contacting step.

27. The method of claim 24, further comprising a capping step practiced after said adding step and before said washing step.

10 28. The method of claim 24, further comprising a capping step practiced after said adding step and before said washing step, wherein a capping buffer is used which contains a capping agent having a non-labile, in situ reporter.

26. A procedure for automating the base addition sequencing scheme comprising the steps of:

15 attaching an oligonucleotide template to a solid support;  
annealing a primer to said template to form a primed template;

20 contacting said primed template with a reaction buffer containing a modified nucleotides, and an enzyme to add one of said modified nucleotide to a 3'-hydroxyl terminus of said primer of said primed template, wherein said modified nucleotides include a blocking group and a reporter;

adding one of said modified nucleotides to said 3'-hydroxyl terminus;

25 capping any unreacted primed templates with a capping agent having an in situ detectable marker;  
washing said primed template with a first wash buffer;  
removing said blocking group and reporter from said added

-25-

modified nucleotide by contacting said primed template with a  
detaching buffer;

detecting said reporter in said detaching buffer after  
removing said reporter from said added modified nucleotide;

5           washing said primed template with a second wash buffer;  
and

repeating above said steps until said oligonucleotide template  
is sequenced.

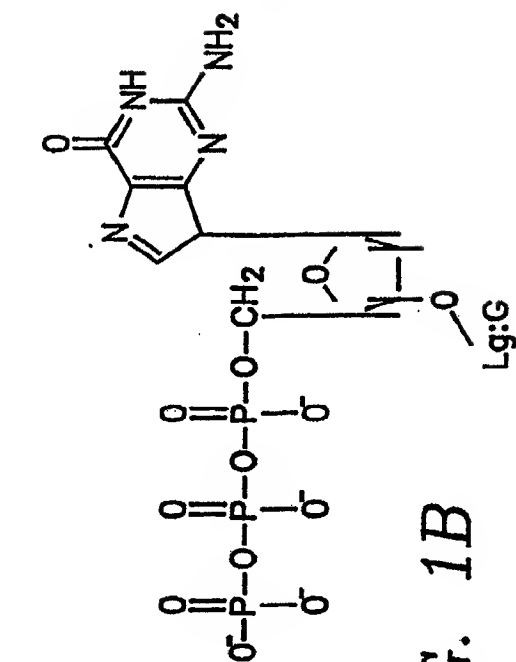


FIG. 1B

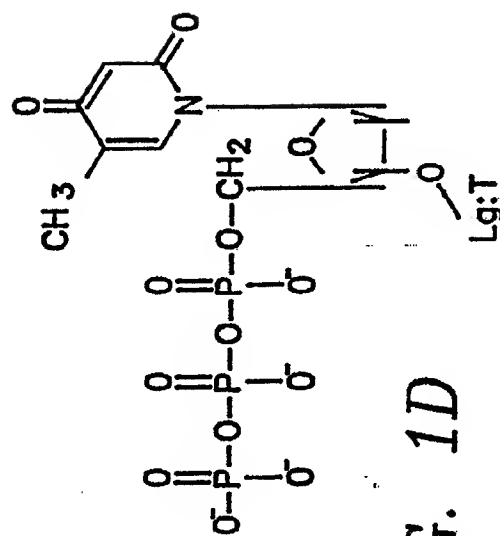


FIG. 1D

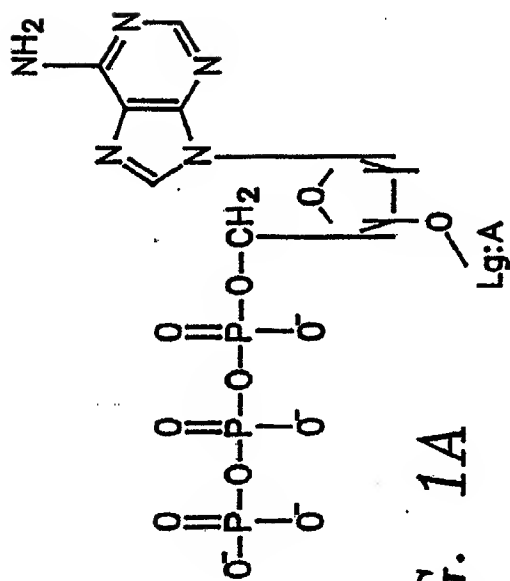


FIG. 1A

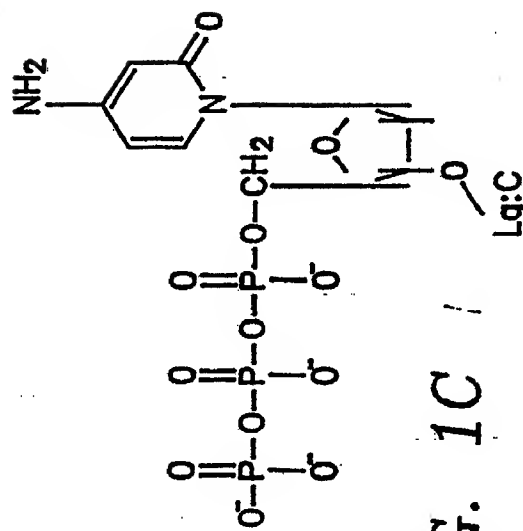


FIG. 1C

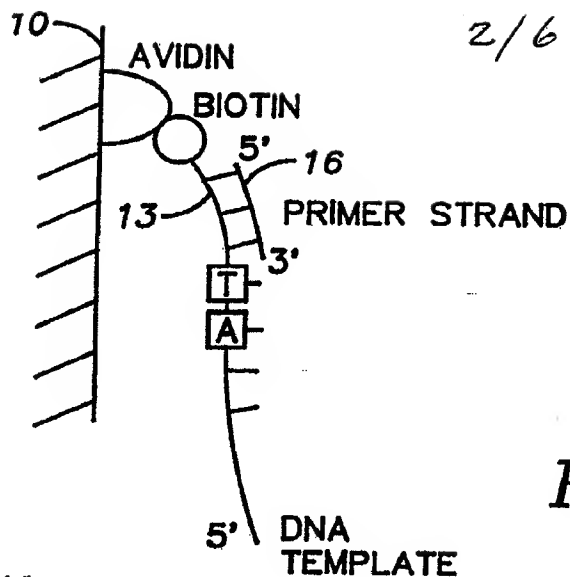


FIG. 2A

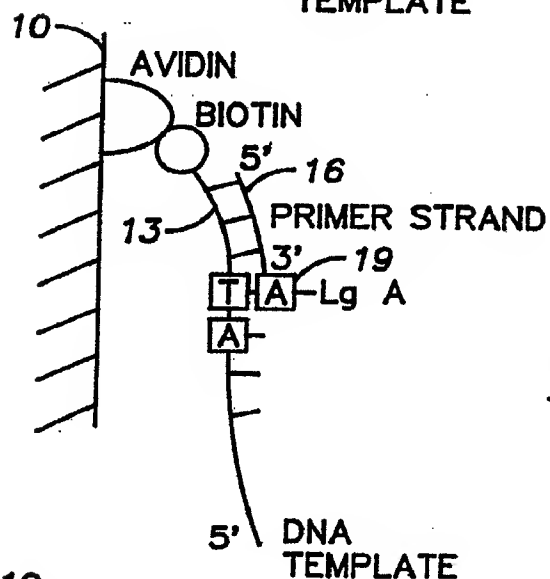


FIG. 2B

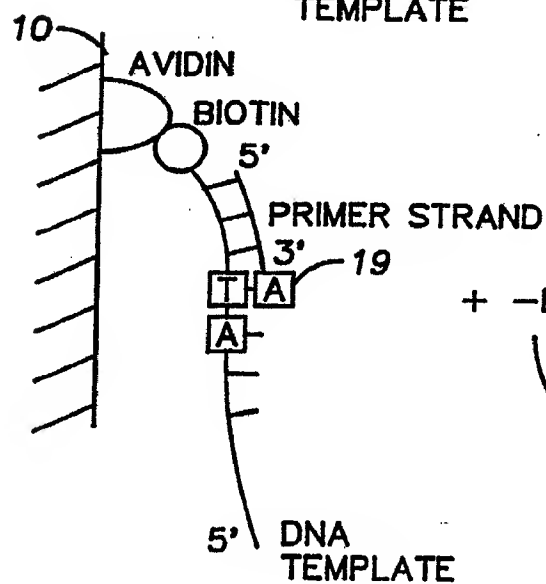


FIG. 2C

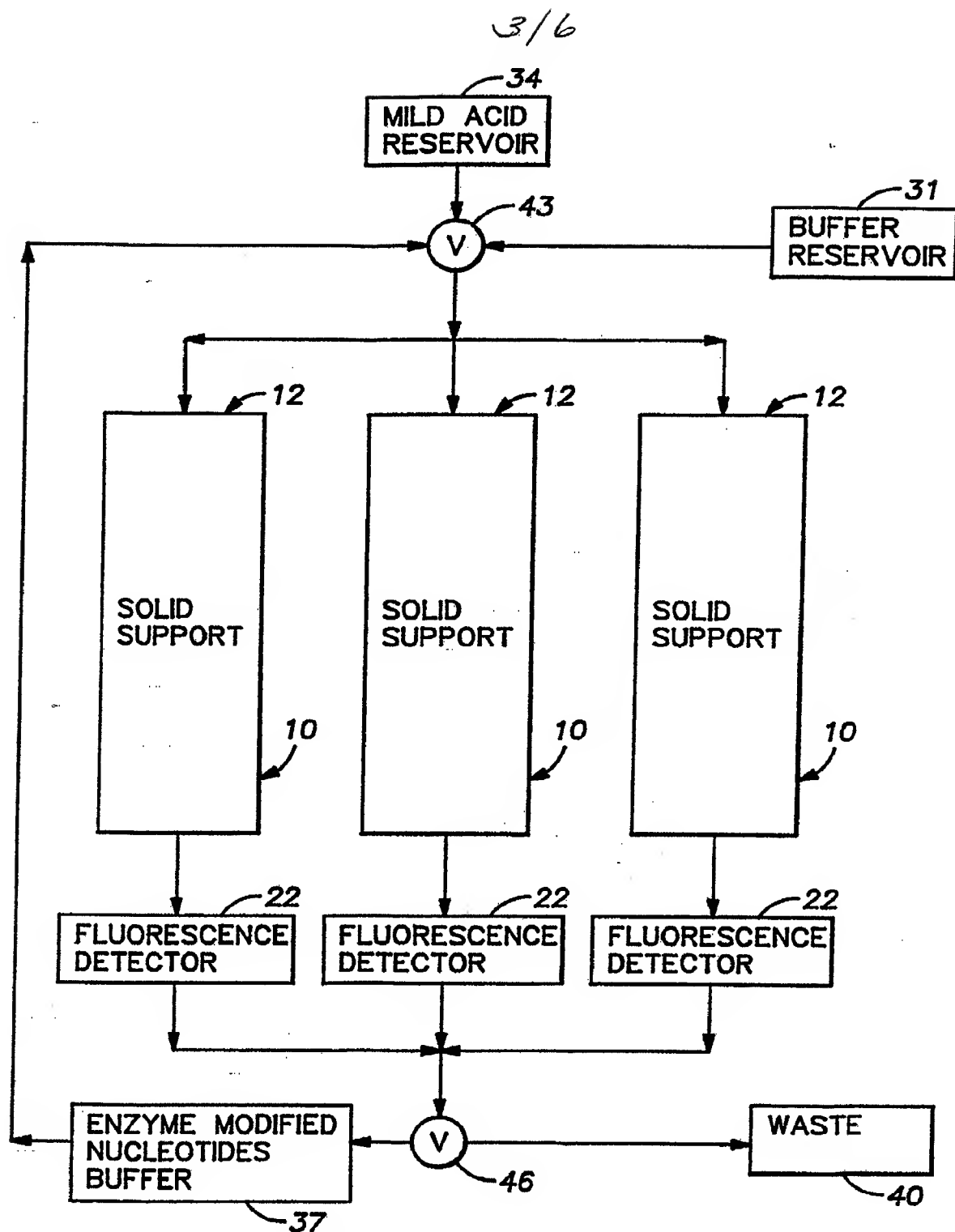
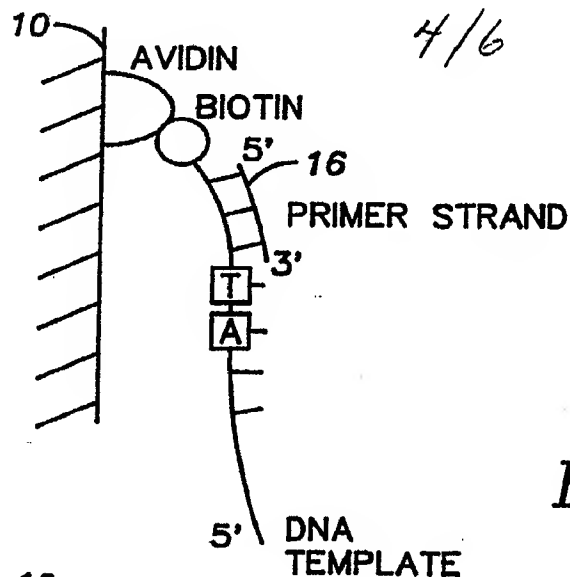


FIG. 3

SUBSTITUTE SHEET



+ [A]-Lg A  
 + [C]-Lg C  
 + [T]-Lg T  
 + [G]-Lg G  
 + ENZYME  
 + BUFFER

FIG. 4A

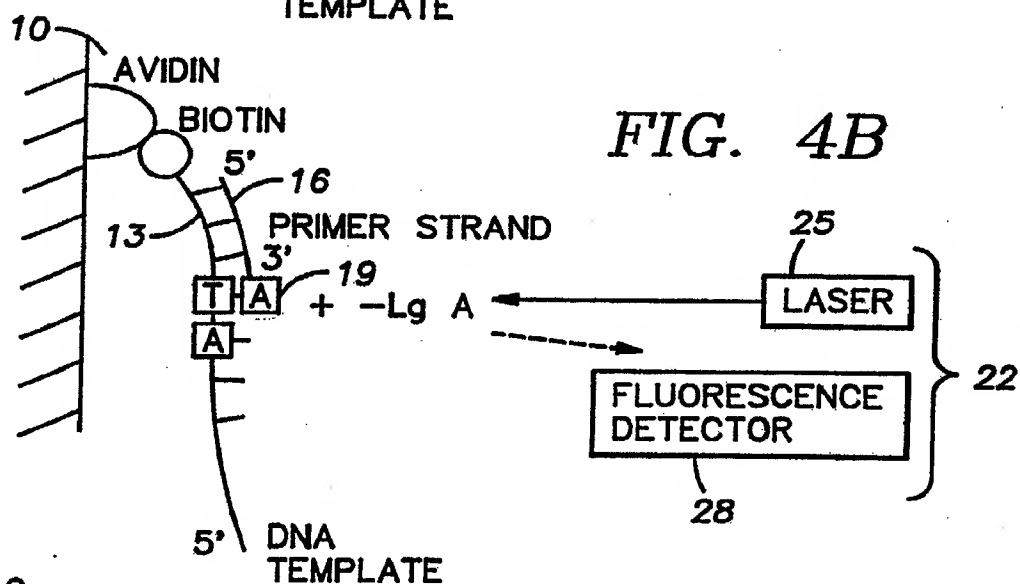


FIG. 4B

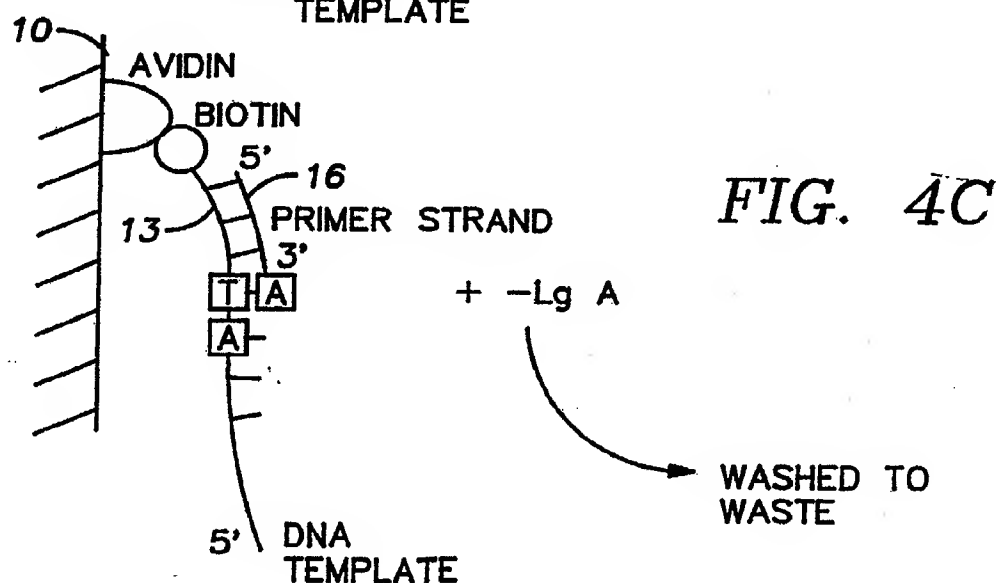
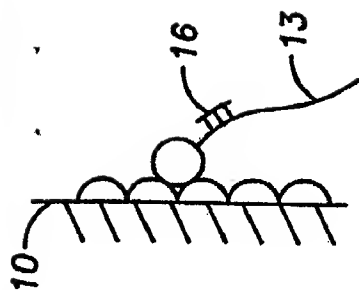


FIG. 4C



5/6

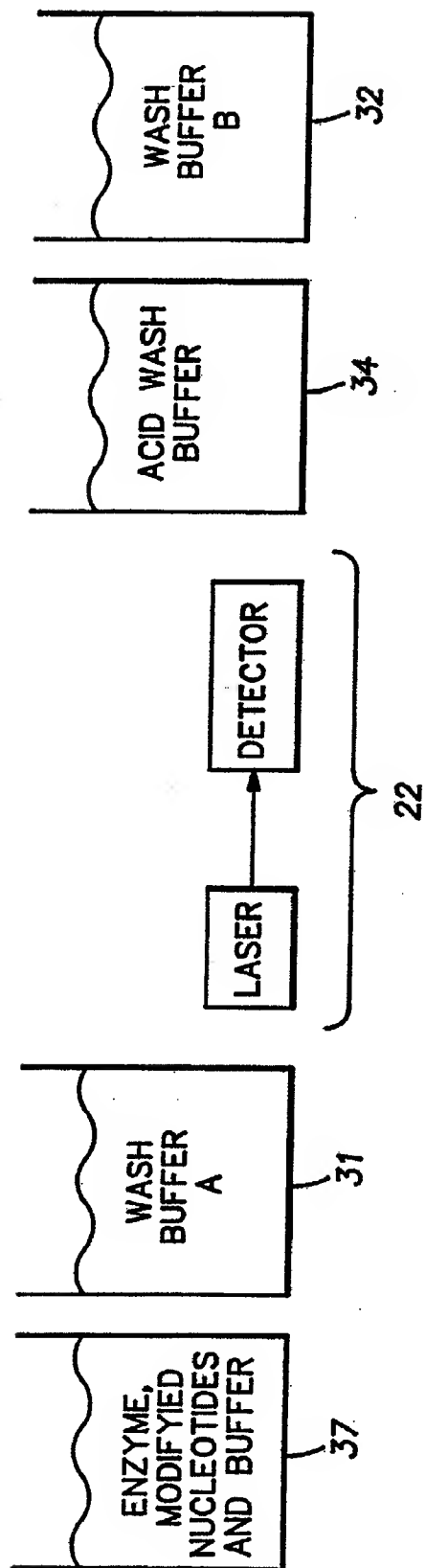


FIG. 5

6/6

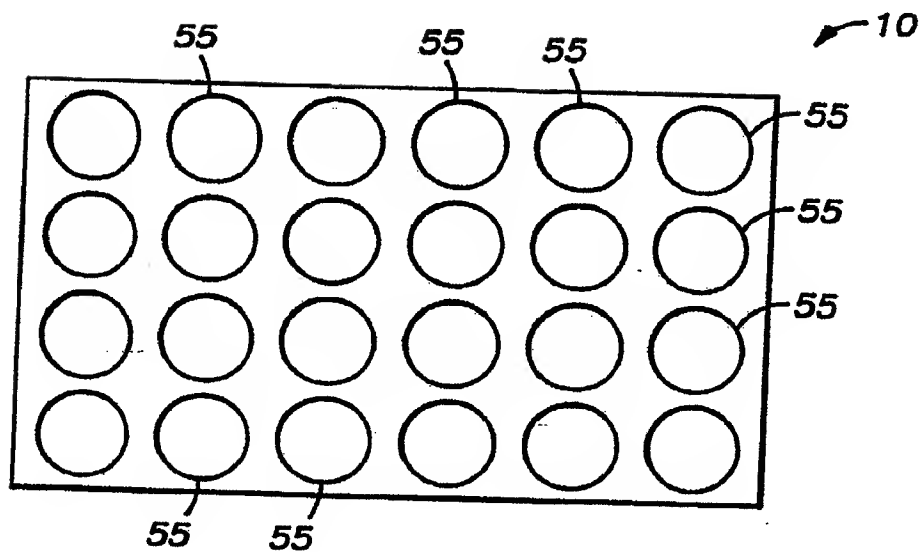


FIG. 6

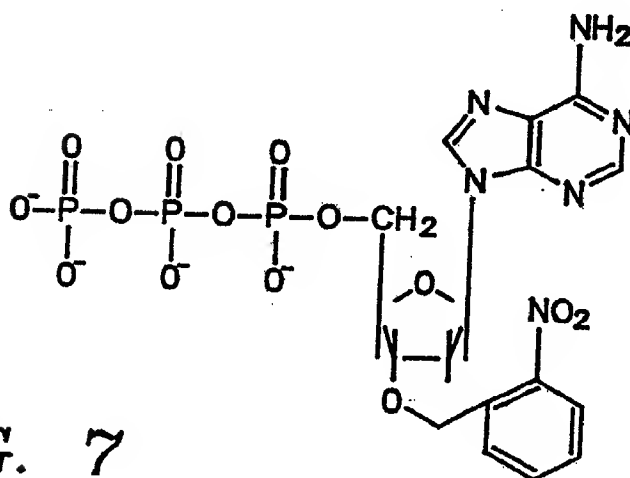


FIG. 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US92/07678

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) :C12Q 1/68  
US CL :435/6

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Messenger (U.S. Patent & Trademark Office)  
Search terms: Sequencing and nucleic acid and device

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GENOMICS, Volume 7, No. 2, Issued 1990., "Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesh-Nyhan families", pages 235-244; abstract no. 7806010.	1-29
Y	GENOMICS, Volume 6, No. 4, Issued 1990, Edwards et al., "Automated DNA sequencing of the human HPRT locus", pages 593-608; abstract no. 7736329.	1-29
Y	US, A, 5,003,059 (BRENNEN) 26 MAY 1991, see entire document.	1-11, 24-29
Y	US, A, 4,972,325 (HARA) 20 MAY 1990, see entire document.	1-29
Y	US, A, 4,849,077 (ROSENTHAL ET AL.) 18 JUNE 1989, see entire document.	1-29
A	US, A, 4,962,037 (JETT ET AL.) 09 OCTOBER 1990, see entire document.	1-29
X	US, A, 4,882,127 (ROSENTHAL ET AL.) 21 NOVEMBER 1989, see entire document.	12-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*E* earlier document published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Z*	document member of the same patent family
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 30 NOVEMBER 1992	Date of mailing of the international search report 16 DEC 1992
Name and mailing address of the ISA/ Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. NOT APPLICABLE	Authorized officer BRADLEY L. SISSON Telephone No. (703) 308-0196

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US92/07678

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

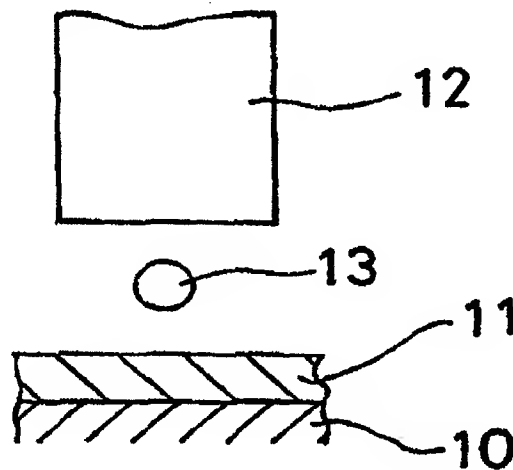
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A, 4,673,657 (CHRISTIAN) 16 JUNE 1987, see entire document.	12-23
A	US, A, 4,942,124 (CHURCH) 17 JUNE 1990, see entire document.	1-11, 24-29

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 <b>G01N 1/00, C12Q 1/68, G01N 33/48,          C12M 1/00, B01J 19/00</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO98/58240</b>  (43) 国際公開日 1998年12月23日(23.12.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02389  (22) 国際出願日 1998年5月29日(29.05.98)  (30) 優先権データ 特願平9/177857 1997年6月19日(19.06.97) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) トヨタ自動車株式会社 (TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒471-8571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 Aichi, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 佐藤至弘(SATO, Yoshihiro)[JP/JP] 〒471-8571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 DE, JP, US.  添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: <b>METHOD OF RETAINING FINE LIQUID DROPLET, REACTION GENERATING METHOD AND REACTION VESSEL</b>  (54)発明の名称 微小液滴の保持方法、反応方法及び反応容器  (57) Abstract A method of retaining a very small quantity of a solution that is discharged by an ink jetting method for generating a chemical reaction stably for a long period of time without causing the solution to be evaporated; wherein a layer (11) of a liquid, such as an oil which is difficult to mix with a very small quantity of a solution (fine liquid droplets) to be retained is formed on a substrate (10), and a fine liquid droplet (13) is retained in the liquid layer (11) and in contact with the surface of the substrate (10). When the fine liquid droplet (13) is water, the liquid layer (11) covering the substrate surface can be an oil.		



(57)要約

化学反応などのためにインクジェット法によって吐出された極微量の溶液を蒸発させることなく長時間安定に保持する。

基板10上に、保持したい極微量の溶液(微小液滴)と混合しにくいオイルなどの液体層11を形成し、その液体層11中で微小液滴13を基板10の表面に接触させて保持する。微小液滴13が水性のとき、基板表面に被覆される液体層11は油性とすることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	CW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CC	中央アフリカ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CI	コートジボワール	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	JP	日本	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KR	韓国	SD	スーダン		
EE	エストニア	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
		LI	リヒテンシュタイン				

## 明細書

## 微小液滴の保持方法、反応方法及び反応容器

## 技術分野

本発明は、化学反応などに用いられる極微量の溶液をガラスプレート表面などに安定に保持する方法、微量の試薬を用いてPCR反応等の反応を行う方法及びそれに用いるに適した反応容器に関する。

## 背景技術

近年、バイオテクノロジーの分野では、PCR (polymerase chain reaction) やEIA (enzyme immunoassay) などの反応が利用されている。これらの反応においては、コスト削減などの観点から、反応液量の微量化が重要である。紙にインクを付着させて文字や画像を可視化するインクジェットの技術は、もともとは印刷のために開発されたものではあるが、極微量の液体を正確かつ高速に分注可能であり、反応液量の微量化のための技術として応用が図られてきた。

特許第4, 877, 745号明細書及びBioTechniques 15, 324(1993)にはインクジェット技術の分注器としての利用法が記載され、米国特許第5, 449, 754号明細書及び米国特許第5, 474, 796号明細書にはインクジェット技術の有機化学合成への応用が記載され、特開平4-262256号公報、特開平4-289457号公報及びAnalytical Chemistry 67, 3051にはインクジェット技術の免疫学的反応への応用が記載されている。例えば、特開平4-262256号公報には、必要な試薬をインクジェットによってフィルム上に印刷しておき、使用時に50 $\mu$ L (マイクロリットル) 程度のサンプル溶液を加え、試薬を溶出させて反応を行い、洗浄、発色を経て検出する方法が記載されている。

このように、化学反応における反応溶液の分注器としてインクジェットを利用することが考えられているが、臨床検査などで多数の反応を並列的に行う場合、試薬コスト低減のため個々の液量はできるだけ少ない方が望ましく、例えば100nL (ナノリットル) 以下とするのが望ましい。しかし、これまでインクジェットを利用して100nL以下、例えば10nL~1pL (ピコリットル) 程度の極微量の液中で臨床検査の反応、例えばPCRや免疫学的反応を行った例は報告されていない。前記した特開平4-262256号

公報の例では、反応時の液量は50  $\mu$ Lであり、極微量とはいえない。

インクジェットを用いて極微量の反応を行った例がこれまで報告されていない理由の一つは、インクジェットで分注した極微量の水溶液は、空気中では数秒程度で蒸発してしまうからである。米国特許第5,449,754号明細書におけるように一瞬で完了する有機化学反応では極微量の反応例が報告されているが、通常の臨床検査の反応には数分から数時間の時間がかかり、その間反応液を蒸発させずに空気中に保持しておくのは困難である。

また、極微量の反応をするために不可欠というわけではないが、蛍光法、比色法などにより反応の有無を検出するとき、反応液が極微量では通常の液量の場合と比べて光路長が著しく短くなり、検出が困難になる。従って、測定の際の光路長を長くするための工夫が必要である。

#### 発明の開示

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みてなされたもので、化学反応などのために例えばインクジェット法によって吐出された極微量の溶液を蒸発させることなく長時間安定に保持する方法を提供することを目的とする。

また、本発明は、インクジェット法などによって吐出された極微量の溶液に対する光学的検出を容易にするため、光路長を増大させる方法を提供することを目的とする。

本発明は、また、インクジェット法によって吐出された微量の試薬を用いてPCR反応などの反応を行わせる方法、及びそれに用いるのに適した反応容器を提供することを目的とする。

本発明では、例えばガラス平板などの基板上に、保持したい極微量の溶液（微小液滴）と混合しにくいオイルなどの液体層を形成し、その液体層中で微小液滴を基板表面に接触させて保持することで前記目的を達成する。微小液滴が水性のとき、基板表面に被覆される液体層は油性とすることができる。また、微小液滴は、基板表面に被覆された液体層の表面からインクジェット技術などにより打ち込むことができる。

基板上に形成する液体層の粘度や膜厚を適当に選択することにより、液体層の表面から打ち込まれた微小液滴は基板表面に付着し、液体層の内部に隠れた状態で安定に保持される。微小液滴は、それと混合しない液体により周囲を覆われているため、蒸発を大幅に減

少することができる。また、基板表面に付着して保持されていて位置が固定されているため、この状態でインクジェット技術によってさらに試薬を追加することも可能である。

例えば、インクジェット法によって液体層に打ち込む微小液滴の量が40 pLのとき、液体層の最適粘度は20～50 cP、最適膜厚は20～30 μmである。基板表面に被覆する液体層の膜厚が薄すぎると、微小液滴はその一部分が液体層から露出し、蒸発してしまう。また、液体層の膜厚が厚すぎると、微小液滴は液体層中を浮遊して位置が定まらないため、試薬の追加などが困難になる。

基板表面に撥水性をもたせることもできる。ここで撥水性とは、基板表面に付着した液滴において、基板表面に対する液滴の立ち上がり角度（接触角）の大きさを表現されるもので、接触角が大きいほど撥水効果が高い。また、本発明においては、通常使用されるガラス基板に付着した液滴の接触角に対して、より大きい接触角を有する基板表面について撥水性を有すると表現する。この撥水性は、基板自体をポリプロピレンなどの撥水性を有する材料で作製することで付与してもよいし、基板上に撥水性材料をコーティングすることで付与してもよい。

基板表面が撥水性を有していると、基板表面に付着した水性の微小液滴は基板との接触面積が小さくなって液体層の膜厚方向に立ち上がる。従って、微小液滴中で生じる化学反応を基板に垂直な方向から蛍光法や比色法などの光学的方法によって検出するとき、光路長が増大するため検出が容易になる。この場合、撥水性を有する基板あるいは撥水性コーティングは、微小液滴の光学的測定に影響を与えるものではないことが必要である。

基板を覆っている液体層中に微小液滴を打ち込んで基板表面に微小液滴を保持したのち、液体層の上に透明なスライドガラス等のカバーをかけるようにすると、加熱の際に生じる対流などによって液体層の液面が乱れるのを防止し、微小液滴が液体層から露出して蒸発するのを防止することができる。カバーをかけるに先立って、液体層に液体を補充してもよい。

また、液体層中に打ち込んだ微小液滴の近くの液体層中に他の水性液体を配置することも微小液滴を安定に保持する上で有効である。液体層中に保持されている微小液滴は、反応過程で加熱した際などに周囲の液体に溶出して体積が減少する傾向がある。反応を行う水性の微小液滴のすぐ近くに他の水滴を配置すると、微小液滴の近くの液体層の局所的な水分含有量を大きくすることができ、反応を行う微小液滴の溶出防止に効果がある。溶出防

止用の水滴の代わりに、反応を行う微小液滴を密集して配置することでも同様の溶出緩和効果が得られる。

さらに、光学的測定のための光路長増大の点からは、微小液滴を液体層の上に配置した透明カバーにも接触させるのが望ましい。これは、基板とカバーとの間の間隔を狭めて微小水滴を一度カバーに接触させ、そののち基板とカバーの間隔を再び広げることにより実現できる。そのためには、基板とカバーとの間のスペーサとして弾性のある部材を用いるのが好ましい。基板とカバーの間隔を狭める動作は、最も簡単には指でカバーを押圧することによって行うことができるが、精密モータや圧電素子を用いてカバーを基板側に押圧することで行ってもよい。このように微小液滴を基板表面とカバー底面の両方に接触させて保持することにより、微小液滴内の基板垂直方向の光路長を増大することができるとともに、光路長を一定にすることが可能となり、測定の精度及び信頼性を向上することができる。

本発明の反応容器は、透明な下板と、厚さ0.05mm以下のスペーサと、透明な上板とからなり、スペーサで囲まれた領域に溶液を収容することを特徴とする。スペーサは両面接着テープとすることができ、また、溶液との接触部位はウシ血清アルブミンコートをするのが好ましい。

PCRチャンバとしては、エッチング技術によって作製されたPCR小型反応チャンバがいくつか発表されている（例えば、松本壮平、工業技術院機械技術研究所発行「機械研ニュース」533号、No. 5、6～8頁、1996年）。これらの反応容器は、内部全体にPCR反応液を満たして使用するもので本発明の反応容器とは使用方法が異なるが、図21に示した本発明の反応容器は、エッチングで作製されるPCRチャンバと比較しても、①量産品のカバークラスに簡単なコーティングを施し、スペーサも簡単な紙加工で作製するものであるため、構造が簡単で安価である、②エッチングで作製されたPCRチャンバは表面仕上げが粗く、沸騰気泡核が存在し、それによって気泡が発生したり、温度制御が影響を受ける（前述の文献参照）が、本発明の反応容器は、通常のガラス等の材料を張り合わせたものなので、必要なだけ精密な表面仕上げが可能である、③エッチングで作製されたPCRチャンバでは、全体の組立が終わってから、細い流路が詰まらないようにコーティングのための薬品を流し、その後乾燥させるというコーティングの方法をとり、この方法で可能なコーティング手法はシリコンコートなどに限られているが、本発明の反応



容器は、組立前にコーティングを行うので、スピナーの利用、ポリマーのラミネート等あらゆる手法が可能であり、内部表面のコーティングが容易である、などの利点を有する。

本発明は、PCR法、イムノアッセイ等の微量試料の反応に適用することができる。高温反応（50℃以上）を伴うPCR以外の生化学反応、例えばLCR（リガーゼチェーンリアクション）ハイブリダイゼーション等にも有効である。本発明による反応方法は、微小液滴を基板表面に被覆された微小液滴と2相に分離する液体層中で基板表面に接触させて保持するとともに液体層表面をカバーで覆い、微小液滴中で反応を行わせることを特徴とする。微小液滴はDNAを含む水性液滴とすることができ、基板表面に被覆された液体層は油性の液体層とすることができる。

微小液滴はインクジェット技術によって吐出することで基板表面に付着させることができる。微小液滴は、予め油性の液体層で被覆されている基板に、その液体層の表面からインクジェットヘッドによって基板表面に達するように打ち込んでもよいし、液体層で被覆されていない基板表面に直接吐出して付着させ、その後に油性の液体層を塗布するようにしてもよい。

微小液滴の接触部位は、シリコンコートなどの酵素吸着防止剤を有するのが望ましい。また、微小液滴の接触部位はウシ血清アルブミンコートを有するのが好ましい。ウシ血清アルブミンコートは、特に微小液滴を液体層で被覆されていない基板表面にインクジェットヘッドから吐出して付着させる場合、微小液滴の付着性を改善する効果がある。

反応容器内部のコーティングとしては、これ以外にも種々のコーティングを利用することができる。反応容器内面のコーティングの条件としては、一般に、①酸素の吸着が少ないこと、②水滴の付着性が良好であること、が望ましいが、これらの条件を満たすコーティングとして、親水性ポリマーによるコーティングがある。これらのコーティングは、もともと人工臓器などの医療器具や分析用キャピラリカラムにおいてタンパク質の吸着を防止するために開発されたもので、これまで多数の例があり、容易に反応容器のコーティングに適用可能である。

親水性ポリマーとしては、例えば、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドンなどがあげられる。また、水に不溶な、医療器具のコーティングなどに使用される親水性ポリマーとしては、例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン- $n$ -ブチルメタク

リレート)共重合体などがあげられる。(岩崎ら、表面技術、46巻、10号、880～886頁、1995年)、この中で、市販されていて入手しやすいポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)を例にコーティング方法の一例を説明する。

ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(シグマ アルドリッチジャパン製)0.2gをジメチルホルムアミド(ナカライ製)2mLに溶解した。図41に示すように、このコーティング液143をロの字型スぺーサシール142を張り付けたカバーガラス141上のガラスが露出している中央部分に20 $\mu$ L塗布した。このとき、もし、スぺーサシール142がなければ、塗布した液はガラス表面ではじかれてしまい、均一に塗布することが不可能になる。塗布終了後、真空乾燥すると、図42に示すように、均一な透明なコートが得られた。

また、タンパク質の材料表面への吸着を防ぐため、キャピラリ電気泳動の分野では、キャピラリ内面(熔融石英)に共有結合的にポリマー固定する方法が知られており、反応容器のコーティングに適用できる。例えば、ポリエチレングリコールの固定(G. J. M. BRUIN ら、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィ、471巻、429～436頁(1989年))、ポリアクリルアミドの固定(S. HJERTEN ら、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィ、347巻、191～198頁(1985年))などがある。

さらに、シリコンコートと同等以上の効果を持つコーティング法として、フッ素樹脂によるコーティングがある。フッ素樹脂によるコーティング法は多数知られている。この場合も、さらに、ウシ血清アルブミンを塗布するなどの水滴付着性を増加させる処理が必要である。

なお、薬品による表面処理は、時にはコストが高く、効果が低い場合が考えられる。このような場合には、反応容器に薄いタンパク質が吸着しにくい樹脂フィルムを張り付ける方法を用いてもよい。利用できる樹脂フィルムの一例としては、フッ素樹脂フィルム、サイトップ(旭硝子製)があげられる。この場合、フィルム表面の撥水性が高いため、さらに、ウシ血清アルブミンを塗布するなど水滴付着性を増加させる処理が必要である。また、水滴付着性を向上させるための方法として、イオンビーム等の照射(例えば、雀部ら、高分子加工、44巻、10号、434～439頁、1995年)を利用してもよい。

基板表面に被覆された液体層は、オイル中への試薬溶液溶出防止の観点から、厚さが100 $\mu$ m以下とするのが好ましい。

本発明の反応方法によると、反応1バッチあたりの液量が微量化され、試薬コストを低減することができる。また、コピー数が同じであれば、反応液量が少ないほどサイクル数が短縮できる。たとえば、反応液量が1/1000になれば、理論上  $\log_2 1000 = 10$  サイクル短縮される。サイクル数短縮によって、反応時間が短縮し、また、副反応（非特異的増幅、プライマー2量体生成）が減少するため、ターゲット検出限界が向上する。

さらに、本発明の反応方法によると、PCRの量子化による定量が可能になる。すなわち、ひとつの反応液をたくさんのバッチに小分けすると、各バッチ毎にターゲットが1コピー存在するかしないかという状態になる。この状態で、PCRを行うと、ターゲットの濃度に比例して、PCRが進行したバッチの数が増加する。そのため、PCRが進行したバッチ数を計数することにより、元のサンプル中のターゲット濃度の正確な測定が可能になる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、油膜を被覆したカバーガラスにインクジェットノズルから微小液滴が打ち込まれる様子を模式的に示した図、図2は微小液滴が保持されている状態を説明する図、図3は油膜に打ち込まれた水滴の状態の一例を説明する図、図4はカバーガラスをプリンターにセットするための台紙の説明図、図5はインクジェットノズルによる水滴の打ち込みパターンを説明する図、図6は打ち込まれた微小液滴の保持に失敗した状態の一例を示す説明図、図7は打ち込まれた微小液滴の保持に失敗した状態の一例を示す説明図、図8は保護用水滴あるいは複数の反应用水滴の配置図、図9は反応容器の作製方法を説明する図、図10は隣接する2滴の水滴の透過微分干渉像を示す顕微鏡写真、図11は微小液滴中の光路長増大方法の説明図、図12はカバーと基板表面の間隔を調整する機構の一例の説明図、図13はヒト男性DNAが入っている試料（+）と、入っていない試料（-）の蛍光スペクトルを示す図、図14は水滴の透過顕微鏡写真、図15は（+）の水滴と（-）の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真、図16はカバーガラス上の油膜を他のカバーガラスで挟む方法の説明図、図17は水滴の透過顕微鏡写真、図18は（+）の水滴と（-）の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真、図19は基板表面を撥水性とすることによる効果の説明図、図20は新たな液滴の追加の説明図、図21は本発明による反応容器の分解組立図、図22は反応容器内にPCR反応液を入れた反応容器の使用状態の一例を示す上面図、図23は本発明によるホルダーの一例の分解組立図、図24は反応容器を組み込んだホルダ

一の全体図、図25は反応容器を組み込んだホルダーの分解組立図、図26は本発明のホルダーを使用した場合の温度変化を示す図、図27は比較例（上蓋あり）の温度変化を示す図、図28は比較例（上蓋なし）の温度変化を示す図、図29は比較例（アルミホイル使用）の温度変化を示す図、図30は比較例（断熱材使用）の温度変化を示す図、図31は本発明によるホルダーの他の例を示す分解組立図、図32は反応容器を組み込んだホルダーの分解組立図、図33は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図34は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図35は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図36は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図37はDNAポリメラーゼの濃度を変化させた反応液の反応終了後の蛍光スペクトルを示す図、図38は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図39は温度サイクルをかけたサンプル（+）と、かけないサンプル（-）の蛍光におけるRとGの割合をプロットした図、図40は電気泳動による分析結果を示す写真、図41は反応容器に親水性ポリマーを塗布する手順を示す説明図、図42は反応容器に親水性ポリマーを塗布する手順を示す説明図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、図面を用いて本発明の実施の形態を説明する。

##### 実施の形態1

ここでは、微小液滴を保持する基板として顕微鏡観察用のカバーガラスを、微小液滴として水滴を、基板表面に被覆する微小液滴と混合しにくい液体としてオイルを用い、カバーガラス表面を被覆している油膜の中にインクジェットノズルから水滴を打ち込んで、水滴が基板表面に安定に保持される条件を探索した。

図1は、油膜を被覆したカバーガラスにインクジェットノズルから水滴が打ち込まれる様子を模式的に示した図である。スライドガラス10の表面には油膜11が塗布されている。インクジェットノズル12から所定の速度で吐出された水滴13は、スライドガラス10の上方からその表面を被覆する油膜11中に打ち込まれる。油膜11中に打ち込まれた水滴13は、図2に示すように、水滴13の全体が油膜11の内部に隠れ、なおかつスライドガラス10の表面に付着した状態にする。この状態で、水滴13は油膜11に保護され、蒸発することなく長時間安定に保持される。また、スライドガラス10の表面に付

着しているため、水滴13の位置的安定性も確保される。

基板10に塗布する油膜11の粘度、膜厚は、打ち込む水滴13の量、速度によって最適な値の範囲が決まる。油膜11の粘度、膜厚が不適切であると、図3(a)のように水滴14が油膜11の上部に露出して空気に触れ、蒸発してしまう。あるいは、図3(b)のように水滴15が油膜11の内部に浮いてしまう。油膜中に浮遊した水滴15は、やがては油膜と空気のと境界に到達し、蒸発してしまう可能性が高い。

水滴を多く分注すると、図3(c)のような状態になることが多い。これは、油膜11の内部に水滴16が入ったものの、油膜11の表面がくぼんでいる状態である。オイルの粘度が不適切な場合、図3(c)の状態からすぐに図3(a)のような状態に移り、水滴の表面から油膜がなくなって、やがて蒸発してしまう。しかし、オイルの粘度が適切な場合、水滴の表面に油膜はしばらく保持される。この場合には、図3(c)の状態の時にさらにオイルを加えることで、図2のような状態にもっていくことができる。

次に、具体的な例について説明する。微小液滴を吐出するために、セイコーエプソン社製のインクジェットプリンタMJ-500Cを実験に使用した。モノクロ印字用ヘッドに、東レ製「TORAY PURE LV-10T」で製造した超純水を充填し、吐出させた。プリンタの制御は、パーソナルコンピュータ(NEC製、PC9801ns)でコントロールコード「EPSON ESC/P J84」のイメージ処理機能を使用して行った。

このときの縦方向、横方向のドット密度はいずれも360ドット/インチであった。このプリンタの解像度はセミ720dpi(720dpi×720dpiで、隣接するドットは印刷しない)であるので、1ドットは実際には2滴からなると思われる。超純水を98304ドット吐出したとき、全体の液量は4.0μLであったので、1ドットあたりの液量は約40pLである。

水滴を付着させる基板としては、顕微鏡観察用カバーガラス(マツナミ製、18mm×18mm、厚さ0.12~0.17mm)を使用した。このカバーガラスをプリンタにセットするため、図4に示すような台紙を使用した。台紙20は、コピー用紙又はオーバーヘッドプロジェクタ用の透明シートで作り、図中に斜線で示した左下の10mm×10mmの部分21を観察用にくり抜いたものである。この台紙のくり抜かれた部分を含む18mm×18mmの部分22に両面接着テープ(ニチバン製セルタックCW-18)でカバ

ーガラスを裏側から接着した。

カバーガラスを接着した台紙をプリンタにセットし、カバーガラス上に後述するオイルからなる油膜を塗布した。油膜を塗布する範囲は、カバーガラスの中央部10mm×10mmの台紙がくり抜かれた部分21である。マイクロピペットで一定量(1μL~5μL)のオイルをカバーガラス上においたあと、ピペットの先端で10mm×10mmの範囲に均等に塗布した。

油膜を塗布したあと、プリンタで水滴を打ち込んだ。水滴の打ち込みパターンは図5に示したとおりであり、1ドットの水滴25を8/360インチ(0.56mm)の間隔で、縦横それぞれ4つずつ、計16カ所に打ち込んだ。

顕微鏡(オリンパス光学工業製倒立型顕微鏡1MT-2)で観察すると、打ち込まれた水滴の保持に成功した場合には、水滴が油膜の底でカバーガラスに付着し、水滴全体が油膜の内部に隠れた状態になる。この状態を模式的に表すと図2のようになる。このとき、水滴は直径約100μmで、ほぼ円形に観察された。

打ち込まれた水滴の保持に失敗した場合には、図6のように、油膜11がとぎれてカバーガラス10の表面がむき出しになって観察されることがある。これは、図3(a)の状態から水滴が蒸発したものと考えられる。また、観察される水滴の大きさが異常に小さい(直径50μm以下)ことがある。これは、図3(a)の状態からある程度水滴が蒸発した後、図2に示す正常な保持状態になったためと思われる。水滴が実際にこのようにして蒸発していく様子を時には顕微鏡下で観察できることもある。このようなタイプの失敗は、主として油膜が薄すぎる場合に起こる。

また、図3(b)に示すように、水滴が油膜中に浮遊しているのが観察される場合もある。あるいは、図7のように、離れた場所に2つの水滴32, 33が観察されることもある。これは、1ドットが2滴からできているため、2つの水滴が油膜11中を漂ったのち、別々の場所でカバーガラス10に付着したためと思われる。このようなタイプの失敗は、主として油膜11が厚すぎる場合に起こる。

最適な油膜の条件を検討するため、オイルの種類、及び膜厚を変えて図5のようなパターンで水滴を打ち込む実験を3回行い、水滴が正常な状態で保持される割合、すなわち図2に示したように、水滴13の全体が油膜11の内部に隠れ、なおかつスライドガラス10の表面に付着した状態になる割合を調べた。結果を表1に示す。表中の数字は、水滴打

ち込みの成功率 (%) を表す。また、オイルとしては以下のものを使用した。

A : シグマ社製ミネラルオイルM5904 (粘度20 c p)

B : 信越化学工業 (株) 製シリコンオイルKF96-30 (粘度30 c p)

C : 上記Bと下記Eを1 : 1の割合で混合したオイル

D : ベックマン社製真空拡散ポンプ用オイル330246 (粘度40 c p)

E : 信越化学工業 (株) 製シリコンオイルKF96-50 (粘度50 c p)

F : 昭和石油製粘度計校正用標準液 (粘度50 c p)

G : 昭和石油製粘度計校正用標準液 (粘度100 c p)

H : 昭和石油製粘度計校正用標準液 (粘度200 c p)

表1

オイルの 種類	塗布したオイルの量 ( $\mu$ L)				
	1	2	3	4	5
A	42	65	58	27	0
B	100	100	58	23	6
C	100	100	96	77	0
D	100	100	85	38	0
E	94	98	79	27	0
F	6	54	10	0	0
G	10	48	27	2	0
H	0	15	27	17	0

表1より、ここでの実験条件に対して最適なオイルの粘度は30~40 c p、オイルの量は1~2  $\mu$  L (油膜の厚さに換算して10~20  $\mu$  m) であることがわかる。

#### 実施の形態2

実施の形態1で説明したように、微小液滴を保持する基板上に油膜を塗布し、その油膜内部に微小液滴を保持することにより、空気中への水滴の急速な蒸発を防止することができる。しかし、これだけでは極微量の反応を行うのに充分とはいえない。通常、オイルは一定の水分を含有することができる。例えば、シリコンオイルの場合、含有できる水分は100~200 p p mである。そのため、油膜中に長時間極微量水滴を放置したり、反応を促進するために加熱したりすると、微小液滴中の水分が周囲の油層に溶出し、蒸発した

のと同じ状態になってしまう。

水滴の油層への溶出を防止するための効果的な方法としては、図8 (a) のように、実際に化学反応を行う水滴40のまわりに保護用の水滴41を配置すればよい。このように配置すると、反応用水滴40の油層への溶出速度が遅くなる。これは、反応用水滴40付近のオイルの水分含量が保護用水滴41によって局所的に上昇するためと考えられる。

保護用水滴41の組成は何でもよく、ただの蒸留水でもよい。反応用水滴40は高価な試薬を含むため、量を増やすとコストがかかることになるが、保護用水滴41は安価なため量を増やしてもコストは無視できる。したがって、保護用水滴41は、必要なだけ量を多くすることができる。保護用水滴41は、反応用水滴40のまわりにたくさんあればよく、例えば図8 (b) に示すように反応用水滴40を包囲して配置するなど種々の配置が考えられる。保護用水滴41を使用する代わりに、図8 (c) に示すように、反応用水滴40同士を互いに密集させて配置しても同様に反応用水滴の油層への溶出速度を緩和する効果が得られる。

次に、保護用水滴を配置することの効果についてより詳細に説明する。実施の形態1と同様に、セイコーエプソン社製のインクジェットプリンタMJ-500Cを用い、モノクロ印字用ヘッドに、東レ製「TORAY PURE LV-10T」で製造した超純水を充填し、マツナミ製顕微鏡観察用カバーガラス(18mm×18mm、厚さ0.12~0.17mm)を実施の形態1と同様に、図4に示す台紙にセットしてその上に超純水を打ち出した。カバーガラスに塗布したオイルはシグマ社のミネラルオイルM5904、量は3 $\mu$ Lである。打ち出しパターンは図5と同じであるが、重ね打ちを10回行った。そのうちオイルをさらに20 $\mu$ L追加し、顕微鏡で観察したところ、16カ所の水滴全てが同じように直径240 $\mu$ m程度の円形に見えた。

その後、図9に示すように、コの字形に切った両面シール(宝酒造製、in situ PCR用シール、厚さ約150 $\mu$ m)45をカバーガラス10の端の方に貼り合わせ、この上からさらにもう一枚カバーガラスを貼り合わせた。図中、ハッチングを施した部分46は、油膜のある領域を指す。そして、シールのない部分47をマニキュアで固めて、密閉した。

こうして作製した反応容器を図4に示した台紙から剥がし、サーマルサイクラー(パーキンエルマー社製DNAサーマルサイクラー480)のヒートブロック上に載せ、94℃1分、55℃1分、72℃1分の温度サイクルを24回繰り返したのち、水滴の状態を顕



微鏡で観察した。図10は、隣接する2滴の水滴の透過微分干渉像を示す顕微鏡写真である。図の左側が中央部の方向である。左側、すなわち中央部の水滴の方が盛り上がっているように見え、水滴の量が多いことが分かる。ピントがぼけて黒く点々と見えるのはカバーガラスに挟み込んだ内部に付着した水滴であり、この水滴も中央部の方が多い。このように、全部で16カ所ある水滴のうち、周辺部にある12カ所の水滴は、中央部の4カ所の水滴と比べて量が少なくなっていた。これは、中央部の水滴に対して、周辺部の12の水滴が前述の保護用水滴の役割を果たしたためと考えられる。

次に、前記と同様にして超純水をカバーガラス上に打ち出した。ただし、塗布したオイルの量は2 $\mu$ L、重ね打ち回数は2回である。打ち終わったあと、2 $\mu$ Lのオイルを追加し、カバーをかけずにそのままサーマルサイクラーのヒートブロック上に載せ、前記と同様の温度サイクルを開始した。すると、最初に94℃に温度が上昇した時点で油膜の液面が乱れ、水滴が空気中に露出し、蒸発してしまった。このことから、油膜の上面にカバーをかけるのが有効であることが分かる。

### 実施の形態3

極微量の水滴中で進行した反応を検出する方法としては、水滴の吸光度、蛍光、発光等の光学的変化を測定する方法が最も有力である。この場合、図11(a)に示すように、水滴の付着している基板10の表面と油膜11の上面にかけるカバー50に透明な材料を使用し、これらと垂直な方向から励起光の照射、蛍光、発光、透過光の観察を行うのが合理的である。ところが、一般的な光学セルなどを使用する場合と比べて、光路長が短く、しかも一定しないため、定量的な観察をしにくいという問題がある。

そこで、この問題の解決策として、図11(b)に示すように、水滴が付着している基板10の表面と油膜11の上面に設置したカバー50との間隔を一旦狭めて水滴13をカバー50に接触させ、そののち再び図11(c)に示すように間隔を広げる方法を採用した。これによって、水滴13が基板表面と垂直な方向に引き延ばされ、水滴13中の光路長を最初より長く、しかも一定にすることができる。

カバー50と基板10の表面の間隔を調整する機構として、最も単純な方法は、図12(a)に断面を略示するカバー50、基板10、基板とカバーとの間隔を規制するスペーサ52、53等に弾性のある部材を使用し、図12(b)に示すようにカバーに基板表面との間隔を狭めるような力を加える方法である。この力は指で加えてもよいが、精密モー

タや圧電素子などを使用して力を加えてもよい。

次に、微小液滴を基板表面とカバーガラスの両方に接触させて光路長を増大したことによる効果について、より具体的に説明する。パーキンエルマー社の「TAQMAN PCR試薬キット」を用いて溶液を調整した。まず、キットの説明書に従って、次の〔表2〕のように試薬を混合した。

表2

試薬	最終濃度
KCl	50 mM
Tris-HCl、pH8.3	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
dATP	200 μM
dCTP	200 μM
dGTP	200 μM
dUTP	400 μM
β-アクチンフォワードプライマー(配列番号1)	300 nM
β-アクチンリバースプライマー(配列番号2)	300 nM
β-アクチンプローブ(配列番号3)	200 nM
AmpliTaq DNAポリメラーゼ	0.25 U/μL
AmpErase UNG	0.01 U/μL
ヒト男性DNA	0.2 ng/μL
(ヒト男性DNAは、入っているものと入っていないものの2種類を調製した)	

配列番号1 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'

配列番号2 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

配列番号3 5'-(FAM)ATGCCC-X(TAMRA)CCCCCATGCCATCCTGCGTp-3'

ただし、Xはリンカー部がついているヌクレオチド、pはリン酸化を示す。FAM, TAMRAは蛍光色素名である。

ヒト男性DNAが入っているもの(+)、入っていないもの(-)各300 μLを調製

し、それぞれ6本のチューブに50  $\mu$ Lずつ分割した。これをサーマルサイクラーに入れ、50°C 1分、95°C 1分のあと、92°C 1分、54°C 1分、72°C 2分の温度サイクルを40サイクル繰り返し、さらに72°Cで10分間反応させた。

反応終了後、(+)と(-)の溶液をそれぞれ1本のチューブに集めた。(+)と(-)の溶液それぞれ10  $\mu$ LをTE緩衝液(10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA pH8.0)990  $\mu$ Lに加え、蛍光分光光度計(日本分光工業製、FP-777)で蛍光スペクトルを測定した。

結果を図13に示す。励起波長は488 nmである。ヒト男性DNAの入っているサンプル(+)は、入っていないサンプル(-)と比べて、520 nm付近の蛍光強度が強くなっている。

(+)と(-)の溶液をそれぞれ別のモノクロ用プリンタヘッドに充填し、実施の形態1と同様にしてカバーガラス上に打ち出した。カバーガラス上に塗布したオイルはベックマン社製真空拡散ポンプ用オイル330246で、使用量は2  $\mu$ Lである。打ち出したドットパターンは、縦2ドット×横2ドットの4ドットで5回重ね打ちを行った。(+)のドット群と(-)のドット群は、互いに約0.7 mm離して同一のカバーガラス上に打ち出した。

(+)の溶液と(-)の溶液を打ち出したあと、カバーガラス上に約5  $\mu$ Lのオイルを追加し、顕微鏡(オリンパス光学工業社製、1MT-2)で観察した。図14は、観察された水滴の透過顕微鏡写真である。図14の左側が(+)の溶液からなる水滴であり、右側が(-)の溶液からなる水滴である。水滴は直径約300  $\mu$ mのほぼ円形であった。次に、この2つ並んだ水滴を励起波長約480 nmのB励起で蛍光観察した。図15は、図14のように並んだ(+)の水滴と、(-)の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真である。図15に示されるように、蛍光は弱く、ぼんやりとしか(+)の水滴と(-)の水滴の違いは分からなかった。

次に、(+)と(-)の溶液を同様にカバーガラス上のオイル塗布領域55に打ち出したあと、図16(a)に示すように、カバーガラス10の端部56、57に両面接着テープ(ニチバン製、セルタックCW-18)を2枚重ねて貼り付けた、その上からカバーガラスをもう一枚貼り付けた。この両面接着テープの厚さは約70  $\mu$ mであり、2枚重ね合わせると厚さ約140  $\mu$ mになる。さらに、図16(b)に示すように、テープを貼って

いないカバーガラスの端部に余分にオイル 58, 59 を追加した。

カバーガラス 10 の中央付近を指で押さえ、水滴が油膜の上のカバーガラスに付着したのを確認したあと、ゆっくり指を離した。図 16 (b) のように端部に追加したオイルのおかげで、2 枚のカバーガラスの間に気泡は入らなかった。

図 17 はこうして形成した水滴の透過顕微鏡写真であり、左側が (+) の水滴、右側が (-) の水滴である。このように、水滴は、図 11 (c) の模式図に示したように、円柱状になっていることが分かる。円柱の直径は約  $80\text{ }\mu\text{m}$  であった。B 励起で蛍光観察したところ、図 18 に示すように、(+) の水滴の方が (-) の水滴よりも強く光っている様子がはっきりと分かった。

微小液滴中の光路長を増加させるための他の方法として、水滴を付着させる基板の材料として撥水性のあるもの、あるいは撥水性のコーティングを施したものを使用した。水滴が付着する基板 61 の表面に撥水性がない場合は、図 19 (a) に略示するように基板 61 との接触面積が大きくなるため、基板表面に垂直方向の水滴内の光路長が短くなる。一方、水滴が付着する基板 62 の表面に撥水性がある場合には、図 19 (b) のように基板表面に垂直方向の水滴 64 内の光路長が長くなる。

ここでいう撥水性とは、通常使用されるガラス基板に付着した水滴の接触角に対して、より大きな接触角を有する場合をいい、撥水性のある材料としては、例えばポリプロピレン、ポリエチレンなどの透明な材料を用いることができる。また、撥水性コーティング材は多数市販されており、本発明で用いることのできる撥水性コーティング材としては、例えばシグマ社のシグマコートをあげることができる。

特開平 4-262256 号公報には、撥水性基板の上にインクジェットで吐出した液を載せる示唆があるが、これは本発明のように光路長を増大することを意図するものではない。また、米国特許第 5,474,796 号にも撥水性、親水性のパターンを作った上にインクジェットで液を載せる記載があるが、これは隣り合った液滴を空間的に分けるのが目的であり、同様に光路長を増大することを意図するものではない。

次に、水滴の付着する表面を撥水性とすることの効果を確認するため、マツナミ製顕微鏡観察用カバーガラス ( $18\text{ mm} \times 18\text{ mm}$ 、厚さ  $0.12 \sim 0.17\text{ mm}$ ) にシグマ社のシグマコートを塗布し、乾燥させ、撥水性コートを施した。その後、実施の形態 1 と同様に、図 4 に示した台紙に接着し、インクジェットで水滴を打ち出して、撥水性コートの

ある場合とない場合の水滴の様子を比べてみた。使用したオイルは、信越化学工業製シリコンオイルKF96-30とKF-50を1:1の割合で混合したもので、オイルの塗布量は撥水性コートがあるものが2 $\mu$ L、撥水性コートのないものが3 $\mu$ Lであった。インクジェットヘッドから打ち出した水滴のパターンは実施の形態1と同様にした。

顕微鏡で観察した水滴の大きさ（基板垂直方向から見た水滴の直径）は、撥水性コートのある方が40 $\mu$ m程度であったのに対し、撥水性コートのない方は100 $\mu$ m程度であった。このことから、水滴の状態が図19のようになっており、撥水性コートを設けることによって基板垂直方向の水滴内光路長を増大することができることが分かる。

なお、微小水滴中で化学反応を行うときは、複数のノズルから別々の試薬を同じ場所に吐出し、その場で混合することになる。このとき、図20(a)に示すように、微小液滴13が基板10の表面に付着していると、位置決めが容易であり、水滴（試薬）65の追加、混合が容易である。一方、図20(b)に示すように水滴15が油膜11中を漂っていると、新たな水滴（試薬）65の追加は困難である。このような試薬の追加という観点からも、微小液滴は基板表面に付着した状態で保持する必要がある。

#### 実施の形態4

##### 微量容器のPCR用加熱ホルダー(1)

従来、in situ PCR装置としては、アルミホイルでスライドガラスを包んでヒートブロック上に設置するタイプのもの（例えば、米国特許第5,538,871号明細書参照）、あるいは平坦なヒートブロックにスライドガラスを設置するタイプのもの（例えば、宝酒造TP3000）が知られている。しかし、これらのPCR装置では、前記実施の形態で用いた微量PCR用の反応容器の正確な温度制御困難である。そこで、前述の反応容器を使用して微量PCRを行う際に有用な加熱ホルダーを作製した。

図21は、本発明による反応容器の分解組立図である。図21に示すように、反応容器100は2枚の透明板101, 103を中央に穴の開いた環状のスペーサ102を介して接着した構造を有する。透明板101, 103の材質はガラスまたはプラスチックとすることができ、厚さは0.1~0.2mmが好ましい。スペーサ102は、ポリ塩化ビニルの両面接着テープで構成することができ、厚さ0.02mm程度が好ましい。反応容器100の外形は、例えば18mm×18mmの正方形とすることができる。

図22は、反応容器内にPCR反応液を入れた反応容器の使用状態の一例を示す上面図

である。図 2 1 に示した中央に正方形の穴が開いた正方形のスペーサ 1 0 2 を、下側の透明板 1 0 1 に接着したとき形成される凹部が、反応容器 1 0 0 の液体収容部として利用される。反応容器 1 0 0 の内部はオイルで満たされ、1 0 n L 程度の P C R 反応液の水滴 1 0 4 が数十個内部に点在される。P C R 反応液の水滴 1 0 4 は、インクジェットヘッドから反応容器内に打ち込まれたものである。オイルは、P C R 反応液の水滴 1 0 4 を打ち込む前に反応容器内に満たしておいてもよいし、P C R 反応液の水滴 1 0 4 を打ち込んだ後に水滴 1 0 4 に被せるようにして満たしてもよい。その後、上側の透明板 1 0 3 をスペーサ 1 0 2 の両面接着テープ上に配置して密封することで反応容器 1 0 0 内に反応液が収容される。

図 2 3 は、ホルダー本体の分解組立図である。図 2 3 に示したホルダー 1 1 0 は、図 4 に示した反応容器 1 0 0 を 6 個収容することができる大きさを有し、外枠 1 1 1 と穴あき板 1 1 2 と底板 1 1 3 を接着して作製される。外枠 1 1 1 は、発泡ポリプロピレン等からなる断熱材で作られている。穴あき板 1 1 2 は薄い合成樹脂板からなり、図の例の場合、反応容器 1 0 0 が挿入される貫通穴を 6 個有する。底板 1 1 3 は熱伝導性に優れた薄いアルミニウム、銅などの金属板で作られる。外枠 1 1 1 の内側の側面 1 1 4 にはシリコンゴムが塗布され、断熱材内部へのオイルの侵入を防止している。

図 2 4 は反応容器を組み込んだホルダーの全体図、図 2 5 はその分解組立図である。図 2 5 に示すように、反応容器 1 0 0 をホルダー本体 1 1 0 の外枠 1 1 1 によって形成される凹部にはめ込み、その上から上蓋 1 1 5 をかぶせ、サーマルサイクラーのヒートブロック 1 2 0 の上に設置する。上蓋 1 1 5 は 5 mm 程度の厚さを有し、発泡ポリプロピレン等の断熱材で作られている。反応容器 1 0 0、ホルダー本体 1 1 0、ヒートブロック 1 2 0 の間の熱伝導性を高めるため、隙間はオイルやグリースで満たされている。また、全体の密着性を高めるため、サーマルサイクラーに設置するときは、上蓋 1 1 5 の上に 3 k g 程度のオモリを載せるのが好ましい。

こうして作製してホルダーに反応容器を収容し、温度制御特性を測定した。測定のため、反応容器には P C R 反応液を入れず、代わりに熱電対を挿入した。ホルダーをサーマルサイクラー（パーキンエルマー社、DNA 4 8 0）上に設置し、9 2℃1 分、5 4℃1 分、7 2℃2 分の温度サイクルを実施し、デジタル温度計（横川電機、型番 2 5 7 5）及びペンレコーダー（グラフテック製、型番 S R 6 5 1 2）を用いて反応容器内部の温度を記録

した。図26は、1サイクルの実測温度を示すグラフである。図中の温度が横に書いてある横線は、設定温度、設定時間を示す。図から明らかなように、実測温度は設定温度とほぼ一致していた。

比較のために、スライドグラス上に、ポリ塩化ビニルの両面接着テープからなるスペーサ（図21のスペーサ102に相当）を介してカバーグラスを接着し、カバーグラスとスライドグラスの隙間にシリコンオイルを充填して熱電対を挿入したものを作製した。これを *in situ* 用に平板のヒートブロックを持つサーマルサイクラー（宝酒造、TP3000）に設置し、92℃1分、54℃1分、72℃2分の温度サイクルを実施して、デジタル温度計（横川電機、型番2575）及びペンレコーダー（グラフテック製、型番SR6512）を用いて反応容器内部の温度を記録した。使用したサーマルサイクラーの上蓋を閉めた場合と、閉めない場合について、測定を行った。

図27は上蓋を閉めた場合の測定結果を示し、図28は上蓋を閉めない場合の測定結果を示す。いずれの場合でも設定温度と実測温度に差があることが分かる。特に、上蓋を閉めなかった図28の場合に設定温度と実測温度の差が顕著であることが分かる。

また、比較のために、*in situ* PCR用のヒートブロックを使用しない場合の従来の *in situ* PCRの方法の温度制御特性を調べた。スライドグラス上に、ポリ塩化ビニルの両面接着テープからなるスペーサ（図21のスペーサ102に相当）を介してカバーグラスを接着し、カバーグラスとスライドグラスの隙間にシリコンオイルを充填して、熱電対を挿入した。スライドグラスをアルミホイルで包み込んだ上で、サーマルサイクラー（パーキンエルマー社、DNA480）に設置した。92℃1分、54℃1分、72℃2分の温度サイクルを実施し、デジタル温度計（横川電機、型番2575）及びペンレコーダー（グラフテック製、型番SR6512）を用いて反応容器内部の温度を記録した。その結果、図29に示すように、設定温度と実測温度に差があった。

更に比較のために、*in situ* PCR用のヒートブロックを使用しない場合の従来の *in situ* PCRの方法の温度制御特性を調べた。

スライドグラス上に、ポリ塩化ビニルの両面接着テープからなるスペーサ（図21のスペーサ102に相当）を介してカバーグラスを接着し、カバーグラスとスライドグラスの隙間にシリコンオイルを充填して、熱電対を挿入した。アルミホイルで包み込み、さらに断熱材で覆ってサーマルサイクラー（パーキンエルマー社、DNA480）に設置した。9

2℃1分、54℃1分、72℃2分の温度サイクルを実施し、デジタル温度計（横川電機、型番2575）及びペンレコーダー（グラフテック製、型番SR6512）を用いて反応容器内部の温度を記録した。

その結果、図30に示すように、かなり正確に温度制御されていた。ただし、図26と図30とを比較すると明らかなように、スライドガラスを使用せずに断熱材を直接微量反応容器にかぶせる構造を取る本実施例のホルダーを用いる方が、温度制御の正確性は優れていた。スライドガラスを使用した場合に、温度制御の正確性が劣っていたのは、スライドガラスが断熱材ほど断熱性が良くないためと考えられる。

本実施の形態によるホルダーは、本発明の微量PCR反応容器に適した形状を有する。そして、ヒートブロックと反対側の面に断熱材を使用し、スライドガラスを除去して代わりにカバーガラスを採用しており、断熱材の使用によって温度制御の正確性が高まった。また、温度制御されるべき部分はホルダーの底板113と反応容器本体100だけなので、熱容量が小さく、また、熱伝導が良好なため、サーマルサイクラーの制御パラメーター（ヒートブロックの熱容量、熱伝導率に基づき、通常は変更できない）を変更しなくても制御が可能のため、どのようなサーマルサイクラーを使用しても正確な温度制御が期待できる。

なお、反応容器100は、ときどきシールが不完全で、内部に空気が混入することがあるが、本発明のホルダーを用いると、ホルダー110の全体の底にオイルが満たされるため、反応容器のシールが不完全な場合でも、反応容器内に空気が混入することを防止できる。

本実施の形態で説明したホルダーの変形例として、上面が平板のサーマルサイクラーを使用する場合、底板113を使わず、穴あき板112の下面をヒートブロックに直接粘着させるようにしてもよい。この場合、何回も粘着、剥離可能なことが望ましい。全体の各部品の密着性を高めるため、上部におもりをのせる代わりに、万力のようなものを使って、サーマルサイクラー120とホルダー110を締め付けてもよい。

#### 実施の形態5

##### 微量容器のPCR用加熱ホルダー（2）

本発明の反応容器を保持するホルダーの他の例について説明する。本実施の形態のホルダーは、スライドガラスと同一サイズを有するのが特徴である。このホルダーの使用によ



り、図21に示した本発明の微量PCR用反応容器を一般的な in situ PCR用サーマルサイクラーで利用することが可能となる。

図31は、ホルダーの分解組立図である。ホルダー本体130は、底板132と穴あき板131からなり、両者を接着して構成される。底板132及び穴あき板131は、熱伝導性に優れた金属、あるいは反対に断熱材などで作られる。穴あき板131は、反応容器が収まる穴を複数個有する。ホルダー130の全体寸法は、in situ PCRで使用される顕微鏡用スライドガラスと同一の外寸(75.9mm×26.1mm×1.1mm)を有する。

図32は、反応容器を組み込んだホルダーの分解組立図である。反応容器100は、ホルダー本体130のくぼみにはめ込んで固定される。反応容器100をホルダー130に装着した後、本体の上面に再剥離が容易な接着剤あるいはマジックテープ等によって固定板133を着脱可能に取り付ける。固定板133は、熱伝導性に優れた薄い金属からなり、反応容器100をホルダー本体130に固定する役割を有する。また、ホルダー本体130、反応容器100、固定板133の間の熱伝導性を高めるため、隙間をオイルあるいはグリースで満たす。サーマルサイクラーに設置するときには、固定板133の側をヒートブロックに接触させるようにする。

本実施の形態のホルダーを使用すると、保管の際もスライド用の保管箱が利用できて便利である。また、固定板133は必ずしも必要ではなく、ホルダー本体130と反応容器100が適当な方法で固定されていればよい。

#### 実施の形態6

インクジェットヘッドとして、パソコン用インクジェットプリンタ(MJ500C、セイコーエプソン製)のモノクロ印刷用ヘッドを使用し、インクジェットによって微量の試薬を混合し、10nLのPCRを行った。PCR反応を行うのに先立ち、(1)インクジェットヘッド内部のコーティング、(2)マイクロリットルスケールでの反応容器コーティング、(3)マイクロリットルスケールでの酵素濃度、(4)反応容器表面の水滴付着性の改善、(5)水滴溶出防止のための反応容器内部厚さ、(6)PCR反応促進のための酵素の増量について検討した。

##### (1) インクジェットヘッド内部のコーティングの検討

インクジェットヘッド内部の酵素の吸着を防止するため、コーティングを検討した。P

CRが進行したかどうか光学的に検出するためのシステムとして、タックマンシステム（パーキンエルマー製）を利用することにした。次の〔表3〕のようにPCR反応液を調製した。

表3

ヒトゲノムを鋳型にしたタックマンPCRの組成

試薬	最終濃度
KC1	50 mM
Tris-C1, pH8.3	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
dATP	0.2 mM
dCTP	0.2 mM
dGTP	0.2 mM
dTTP	0.2 mM
β-アクチンフォワードプライマー（配列番号1）	0.3 μM
β-アクチンリバースプライマー（配列番号2）	0.3 μM
β-アクチンプローブ（配列番号3）	0.2 μM
アンプリタック DNAポリメラーゼ	0.1 U/μL
アンピレース UNG	0.01 U/μL
ヒト男性ゲノムDNA （ベーリンガー・マンハイム社製）	1 ng/μL

この反応液を、ヘッドの内部に充填し、パソコン（PC9801ns、日本電気製）に接続されたプリンタに取り付け、カバーガラス上に噴射した。その後、ピペットで0.5 mLチューブに移した。これを繰り返し、合計40 μLの反応液を集め、4本の0.5 mLチューブに小分けし、サーマルサイクラー（DNA480、パーキンエルマー製）にセットし、50℃2分、95℃10分のあと、92℃1分、54℃1分、72℃2分を40サイクル繰り返し、更に72℃10分で反応させる温度サイクルにかけた。

反応終了後、10 μLの反応液に、TE緩衝液（pH8.0）を990 μL加え、蛍光分光光度計（FP777、日本分光製）で、蛍光スペクトルを測定した。励起波長は48

8 nmにした。測定の結果、4つのサンプルいずれからも図33のような蛍光スペクトルが得られた。図33を見ると、蛍光色素FAM由来の520 nmのピークが、蛍光色素TAMRA由来の580 nmのピークよりも小さい。これは、PCR反応が進行しなかったことを示している。原因は、ヘッド内部への酵素の吸着によるものと考えられた。

そこで、酵素の吸着を防止するため、反応液を充填する前に、5%ウシ血清アルブミン水溶液をインクジェットヘッド内部に満たし、室温で一晩放置し、そのあと、同様の実験を行った。蛍光スペクトルを測定したところ、実験した2つのサンプルいずれからも、図34に示す蛍光スペクトルが得られた。図34を見ると、蛍光色素FAM由来の520 nmのピークが、蛍光色素TAMRA由来の580 nmのピークよりも大きい。これはPCR反応が進行したことを示していた。これらの検討により、ヘッド内部の前処理として、ウシ血清アルブミンによるコーティングが有効なことが示された。

#### (2) マイクロリットルスケールでの反応容器コーティングの検討

続いて、反応容器への酵素の吸着を防止するため、コーティングの検討をおこなった。市販の顕微鏡用カバーガラス（マツナミ製）にシグマコート（アルドリッチジャパン製）を塗布、乾燥し、表面をシリコンコートした。そして、図21煮染めしたように反応容器を作成した。カバーガラスからなる透明板101、103の寸法は18 mm×18 mm、スペーサ102として用いた市販の in situ PCR用両面シール（宝酒造製）の寸法は18 mm×18 mm、中央の正方形の穴は、10 mm×10 mm、厚さは0.2 mmである。

下側カバーガラス101と、シール102を張り合わせたところに、前記〔表3〕の組成のPCR反応液20  $\mu$ Lを内側に入れ、そのあと、上側カバーガラス103を張り付けた。これを図25に示したように加熱ホルダーに入れ、サーマルサイクラーに仕掛けて、反応させた。その後、反応容器を破壊して、内部の反応液を取り出し、TE緩衝液（pH 8.0）で薄めて、蛍光スペクトルを測定した。図35はカバーガラス101、103をシリコンコートした場合、図36はシリコンコートしなかった場合の蛍光スペクトルである。カバーガラス101、103をシリコンコートした場合だけ、PCRが進行していたことが分かる。

#### (3) マイクロリットルスケールでの酵素濃度の検討

シリコンコートした反応溶液において必要な酵素濃度について検討した。反応液の組成は次の〔表4〕の通りであるが、DNAポリメラーゼの濃度を変化させた。通常チューブ

内で反応するときと比べて、1倍 ( $0.025 \text{ U}/\mu\text{L}$ )、2倍 ( $0.050 \text{ U}/\mu\text{L}$ )、5倍 ( $0.125 \text{ U}/\mu\text{L}$ )、10倍 ( $0.25 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) にし、これまでと同様に、サーマルサイクラーにかけた後、TE緩衝液で希釈して、蛍光スペクトルを測定した。

表4

## ターゲットDNA取得のためのPCRの組成

Takara Ex Taq (宝酒造製)	12.5 $\mu\text{L}$ (62.5 U)
10 $\times$ Ex Taq 緩衝液 (宝酒造製)	250 $\mu\text{L}$
dNTP混合液 (宝酒造製)	200 $\mu\text{L}$
ヒト男性ゲノムDNA	
(ベーリンガー・マンハイム社製)	25 $\mu\text{L}$ (250 ng)
プライマーF3	25 $\mu\text{L}$ (2.5 nmol)
プライマーR3	25 $\mu\text{L}$ (2.5 nmol)
滅菌水	1962.5 $\mu\text{L}$

図37は、測定された蛍光スペクトルを示す。蛍光色素FAM由来の520 nmのピークと、蛍光色素TAMRA由来の580 nmのピークを比べると、酵素量が2～5倍で一定になり、PCRが進行していることが分かる。また、酵素濃度を通常チューブ内で反応するときと比べて4倍 ( $0.1 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) にし、4個の反応容器に充填して反応したところ、いずれも、図38のような蛍光スペクトルが得られた。

これらの結果から、20  $\mu\text{L}$ スケールで、シリコンコートした反応容器を用いる場合、通常チューブ内の濃度の4倍 ( $0.1 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) 以上の酵素が必要であることが分かった。

## (4) 反応容器表面の水滴付着性の改善

前述のように、反応容器表面への酵素の吸着を防止するためには、反応容器の内面にシリコンコートを実施する必要がある。しかし、シリコンコートを実施した表面は、撥水性が高いため、インクジェットノズルで微小水滴を噴射すると、水滴が容器の表面から飛び跳ね、一定の量を再現性良く分注することが困難である。そこで、反応容器表面の水滴付着性を改善するため、シリコンコートした上に、更にウシ血清アルブミンをコーティングすることにした。

コーティング処理として、5%ウシ血清アルブミン水溶液を染み込ませた実験用ティッ

シュペーパー（キムワイプ、十條キンバリー製）でカバーガラスの表面を拭いた後、再びきれいに拭き取った。処理後のカバーガラスは、見かけは処理前と変わらないが、水滴の付着性が改善されており、インクジェットノズルにより、再現性良く水滴を分注することができた。

#### （５）水滴溶出防止のための反応容器内部厚さの検討

反応容器の下面となるカバーガラスを、プリンタに設置するため、図４で説明したように台紙２０に張り付けた。台紙２０の材質はプラスチック製のシートで、大きさは $70\text{ mm} \times 120\text{ mm}$ 、斜線で示した部分２１（大きさ $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ ）が観察用に切り抜かれており、二点差線で示した部分２２にカバーガラスを接着した。この台紙２０をプリンタに給紙し、カバーガラス上に水滴を分注した。例えば、 $10\text{ nL}$ の水滴を分注するためには、 $7\text{ ドット} \times 7\text{ ドット}$ の正方形を５回重ね合わせる。１ドットの液量は、約 $40\text{ pL}$ であるので、 $7 \times 7 \times 5 = 245$ ドットの液量は、 $245 \times 40 = 9800\text{ pL}$ 、つまり、約 $10\text{ nL}$ となる。

前記〔表４〕の組成の反応液を、インクジェットノズルから約 $10\text{ nL}$ （ $245$ ドット）を分注し、分注後、直ちに、オイル（シリコンオイルKF96-50、粘度 $50\text{ cP}$ 、信越化学製）を上からかぶせ、スぺーサ、上板カバーガラスを順に取り付けて、台紙上に図２１のような反応容器を組み立てた。スぺーサとして、市販の *in situ* PCR用両面シール（宝酒造製）を使用したので、反応容器内面の厚さは約 $200\text{ }\mu\text{m}$ になった。その後、反応容器を台紙から切り離し、図２４、図２５で説明したホルダーに取り付け、 $50^\circ\text{C}$  ２分、 $95^\circ\text{C}$  １０分のあと、 $92^\circ\text{C}$  １分、 $54^\circ\text{C}$  １分、 $72^\circ\text{C}$  ２分を４０サイクル繰り返し、更に $72^\circ\text{C}$  １０分で反応させる温度サイクルをかけてPCR反応をおこなった。

反応終了後、蛍光顕微鏡（BX60、オリンパス光学製）で観察した。ダイクロイックミラーユニットは、WIBキューブで、励起光が $460 \sim 490\text{ nm}$ 、蛍光が $515\text{ nm}$ 以上であった。観察の結果、オイル中の反応液の水滴の大きさが、温度サイクル開始前の約半分になっていた。これは、高温により、水滴がオイル中に溶出したためと思われる。水滴の蛍光評価も、蛍光プローブの濃度が大きく変化しているため、困難であった。

そこで、スぺーサとして、厚さ $50\text{ }\mu\text{m}$ のポリ塩化ビニル製シール（加藤紙工製）を使用した。下記の〔表５〕の反応液の組成で、同様の実験を行ったところ、水滴の大きさは変化なく、溶出は起こっていなかった。これは、反応容器の内部厚さが大幅に薄くなった

ため、オイル全体の体積が減ったこと、オイルと水滴の界面の面積が減少したことによると考えられた。しかし、水滴の蛍光は、温度サイクル前と変化がなく、PCRは進行しなかったと考えられた。

表5

試薬	最終濃度
KC1	50 mM
Tris-C1, pH8.3	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
dATP	0.2 mM
dCTP	0.2 mM
dGTP	0.2 mM
dTTP	0.2 mM
β-アクチンフォワードプライマー (配列番号1)	0.3 μM
β-アクチンリバースプライマー (配列番号2)	0.3 μM
β-アクチンプローブ (配列番号3)	0.2 μM
アンプリタック DNAポリメラーゼ (通常スケールのチューブの場合の4倍の濃度)	0.1 U/μL
アンピレース UNG	0.01 U/μL
ターゲットDNA (配列番号4)	1 ng/μL

さらに、次のような方法で加熱時のオイル中への水滴の溶出量を測定した。

(a) 前述の方法と同様にして、インクジェットプリンタから245ドット (10 nL) の超純水をカバーガラス表面に噴出し、水滴の上にマイクロピペットでオイルを被せた。カバーガラスに口の字型スペーサ (厚さ50 μm) を1~3枚接着し、更にその上からもう1枚のカバーガラスを接着した。このようにして、10 nLの超純水をオイルで満たされた反応容器の内部に封入した複数のサンプルを用意した。反応容器内部の厚さは、口の字型スペーサ1枚の厚さが50 μmなので、スペーサ1枚の時は50 μm、2枚の時は100 μm、3枚の時は150 μmである。オイルとしては、ミネラルオイル (M5904, シグマアルドリッチジャパン) とシリコンオイル (KF96-50, 信越化学) を使用し

た。

(b) 反応容器内の水滴を倒立顕微鏡（オリンパス、IMT-2）で観察し、写真を撮影した。

(c) 続いて、反応容器をホルダー内に格納し、サーマルサイクラーに設置し、反応容器に次の温度サイクルを与えた。

50℃2分、95℃10分 1サイクル

92℃1分、54℃1分、72℃2分 40サイクル

72℃10分 1サイクル

(d) 温度サイクル終了後、再び反応容器内の水滴の顕微鏡写真を撮影した。水滴の顕微鏡写真をスキャナでパソコンに読み込み、画像解析ソフト（NIM Image, National Institute of Health, USA）で水滴の大きさを測定した。反応容器内部の水滴を顕微鏡で観察すると、2枚のカバーガラスに挟まれた円柱状の形状だった。温度サイクルの前後で、反応容器内部の厚さは変わらないので、顕微鏡で観察した水滴の平面的大きさが水滴の体積に比例していると考えられる。

(e) 温度サイクル前後の水滴の大きさを比較し、水滴のオイル中への溶出率を算出した。結果を下記の表6に示す。

表6

スぺーサの枚数	1	2	3
容器内部の厚さ (μm)	50	100	150
ミネラルオイル			
溶出率 (%)	13.8	16.8	27.7
標準偏差 (%)	15.7	23.1	16.0
サンプル数	8	8	7
シリコンオイル			
溶出率 (%)	-0.8	33.6	77.5
標準偏差 (%)	25.5	11.8	2.7
サンプル数	5	5	4

表6において、スぺーサの枚数が1枚でシリコンオイルを使用したときの溶出率がマイナスになっているのは、容器の撓みに基づく実験上の誤差である。表6から、オイル中への水滴の溶出は、容器内部の厚さが厚いほど多く、特に厚さが100 μmを超えると顕著

である。従って、溶出防止のためには容器内部の厚さを100  $\mu$ m以下とするのが好ましい。

#### (6) PCR反応促進のための酵素の増量の検討

反応液量を微量化してゆくと、体積あたりの表面積が増加し、反応液の表面に酵素が吸着し、反応液中の酵素活性が減少すると考えられる。そこで酵素を増量し、微量PCRを検討した。

下記の〔表7〕に示す組成の反応液を使用した。酵素量は、通常スケールのチューブの場合の20倍であった。インクジェットノズルから約10 nL (245ドット) を分注し、反応容器を組み立てた。スペーサとして、厚さ50  $\mu$ mのポリ塩化ビニル製シール(加藤紙工製)を使用した。オイルは信越化学製シリコンオイルKF96-50、粘度50 c pを使用した。

表7

試薬	最終濃度
KCl	50 mM
Tris-Cl, pH8.3	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
dATP	0.2 mM
dCTP	0.2 mM
dGTP	0.2 mM
dTTP	0.2 mM
$\beta$ -アクチンフォワードプライマー (配列番号1)	0.3 $\mu$ M
$\beta$ -アクチンリバースプライマー (配列番号2)	0.3 $\mu$ M
$\beta$ -アクチンプローブ (配列番号3)	0.2 $\mu$ M
アンプリタック DANポリメラーゼ (通常スケールのチューブの場合の20倍の濃度)	0.5 U/ $\mu$ L
アンピレース UNG	0.01 U/ $\mu$ L
ターゲットDNA (配列番号4)	1 ng/ $\mu$ L



50℃2分、95℃10分のあと、92℃1分、54℃1分、72℃2分を40サイクル繰り返し、更に72℃10分で反応させる温度サイクルをかけて、蛍光顕微鏡で観察した。観察の結果、温度サイクルをかけたサンプル(+)と、かけないサンプル(-)を比べると、はっきりと蛍光の変化が観察された。(+)は明るい緑色、(-)は赤っぽい黄色に見えた。この蛍光色の違いは、通常のチューブでタックマンPCRをした場合の、PCRが進行した場合としなかった場合の蛍光スペクトルの違いに対応していた。(+)の水滴の内部では、PCRが進行したと考えられる。

(+)と(-)の反応容器を重ね合わせ、両方の水滴を一枚の顕微鏡写真に写した。フィルムはカラースライドフィルム(エクタクロームダイナEX、ISO100、コダック製)を使用した。現像したフィルムをフィルムスキャナー(クイックスキャン35、ミノルタ製)でパソコンに取り込み、画像解析ソフト(フォトショップ、アドベ製)で解析した。2つの水滴の蛍光画像の中の任意の30点をとって、赤(R)、緑(G)、青(B)に色分解した値を求め、R+G+Bに対する、RとGの割合をプロットしたのが図39である。(+)と(-)がはっきり異なる蛍光を発していることが分かる。

#### (7) 実験例

以上の検討により、次の条件でPCR反応を行うのが有利であることが判明した。そこで、この条件下でPCR反応を行った。

- (a) 反応溶液のオイル中への溶出を防止するため、内面厚さ50 $\mu$ m以下の薄型反応容器を使用(構造が簡単で安価)
- (b) 酸素の吸着防止と水滴の飛散防止を両立させた容器表面コーティング
- (c) 酸素の増量によるPCR反応の促進

10ナノリットルの微量PCRのための鋳型DNAとして、ヒトの $\beta$ -アクチン遺伝子の一部を選んだ。この遺伝子の塩基配列は、ナカジマら、プロシーディング・オブ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンス、82巻、6133~6137頁(1985年)に示されている。このうち、2058番目から2552番目の塩基配列、長さ495bpの部分(配列番号4)を、ゲノムDNAから通常反応スケールのPCRで取得をすることにした。

配列番号4の領域の両端にあたる、プライマーF3(配列番号5)(サワディーテクノロジー製)、プライマーR3(配列番号6)(サワディーテクノロジー製)を設計した。

〔表4〕のPCR反応液の調製を行った。反応液の全体の液量は2.5mLとした。これを50 $\mu$ Lずつ48本の0.5mLチューブに小分けし、サーマルサイクラー（DNA 480、パーキンエルマー製）にセットし、94 $^{\circ}$ C 1分、65 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1.5分が30サイクル、72 $^{\circ}$ C 2分が1サイクルからなる温度サイクルにかけた。

プライマーF3 配列番号5 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGCT-3'

プライマーR3 配列番号6 5'-AATGAGGGCAGGACTTAGCTTC-3'

反応終了後、プライマー等を除去するため、全ての液を一つに集め、限外濾過で精製した。チューブ式限外濾過膜（マイクロコン1000、アミコン製）6本に小分けし、遠心分離器で、500G、24分で濾過した。さらに、各チューブにTE緩衝液（pH8.0）300 $\mu$ Lを加え、遠心分離器で、500G、15分で濾過し、洗浄した。洗浄は2回行った。さらに各チューブにTE緩衝液（pH8.0）10 $\mu$ Lを加え、限外濾過膜上に残った精製サンプルを溶解した。図40は、0.8%アガロースゲル電気泳動による分析結果である。図40の各レーンは各々次の試料の泳動結果を示している。

レーン1：分子量マーカー $\phi$ X174/HincII（2.6 $\mu$ g）

レーン2：限外濾過前反応液（10 $\mu$ L）

レーン3：洗浄後の液（1回目）（10 $\mu$ L）

レーン4：洗浄後の液（2回目）（10 $\mu$ L）

レーン5：精製後サンプル（10 $\mu$ L）

レーン2では、PCRにより一本のバンドが、増幅されていることがわかる。このバンドの位置は、レーン1の分子量マーカーの495bpの位置と同じであり、目的のバンド（長さ495bp）であると判断される。レーン2の下の方に薄く見えるバンドは、プライマー等であり、限外濾過で精製した後のレーン5では除かれていた。このようにして、本発明の反応容器を用いて微量PCRが可能であることが示された。

ここでは、一つの反応容器の中に一つの反応液の水滴がある状態でPCRを行う例について説明したが、実際には、一つの反応液の水滴の直径は数百 $\mu$ mであるため、10mm $\times$ 10mmの反応容器の内部には、数十個の水滴を並べることができる。水滴を多数並べることにより、同時に多種類の反応を実行可能である。また、同じ種類の反応を多数実行

することにより、PCRの量子化によるターゲット濃度の定量も可能となる。また、ここでは、単一のノズルから既に混合された反応液を噴射したが、別々の試薬を別々のインクヘッドノズルから噴射して、蓋を閉めていない反応容器中反応液同士を結合させて混合することも可能である。

インクジェットから試薬を噴射して混合するとき、噴射した液が水滴に突入するとき液が飛び散る場合がある。このような場合、水滴の上部に油膜を形成しておき、その油膜を通して試薬を油膜底部に固定されている水滴中に打ち込んで混合するようにすると、油膜によって噴射液が水滴に到達する前に速度が弱まる効果、及び油膜の存在によって水滴から飛沫が飛び散りにくくなる効果によって液の飛散が防止される。

本実施の形態では、オイルにはシリコンオイルを使用した。しかし、水滴のオイル中への溶出を防止するというために、フッ素系オイルを使用してもよい。フッ素系オイルとしては、例えば、フロリナート（住友スリーエム製）、USL完全フッ素（井内盛栄堂製）があげられる。パラフィンオイル、シリコンオイルの水分含量が100ppm以上であるのに対し、フッ素系オイルでは、10ppm程度なので、オイル中への水滴の溶出の大幅な低減が期待できる。

また、本実施の形態では、10nLの水滴を分注したあとに、オイルを被せたが、オイルを容器表面に薄く塗った後に、水滴を分注することもできる。特に、液量が微量になったり、必要な試薬を分注する合計の時間が長くなる場合（例えば多数のサンプルを、並列処理する場合）は、後者のオイルを先に塗布する方法のほうが空気中への蒸発による液量の変動を防止するために望ましい。

PCRの進行状況を光学的に検出する方法はタックマン以外にも、それらを利用してもよい。例えば、蛍光エネルギー移動を利用したアンプリセンサーシステム（フナコシ製）、エチジウムブロミド等のインターカラーを利用した方法（特開平5-184397号公報）、蛍光偏光の変化を利用した方法（特開平7-23800号公報）などを利用することができる。光学的検出方法以外には、MALDI質量分析の利用も考えられる。反応終了後、反応容器の一方の蓋をはがし、MALDI用マトリックス試薬の追加など、必要な前処理を行って多数の微量なPCR産物の分子量を正確に測定し、点変異や、トリプレットリピートなどの繰り返し数を正確に検出することも可能である。

産業上の利用可能性

本発明によると、極微量の溶液を蒸発させることなく長時間安定に保持することができ、インクジェット法などによって吐出された極微量の溶液による化学反応が可能となる。

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

TCACCCACAC TGTGCCCATC TACGA

25

配列番号 : 2

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

CAGCGGAACC GCTCATTGCC AATGG

25

配列番号 : 3

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

ATGCCCCCCC CATGCCATCC TCGGT

25

配列番号 : 4

配列の長さ : 495

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Homo sapiens

株名 :

配列

CATGTACGTT GCTATCCAGG CTGTGCTATC CCTGTACGCC TCTGGCCGTA CCACTGGCAT	60
CGTGATGGAC TCCGGTGACG GGGTCACCCA CACTGTGCCC ATCTACGAGG GGTATGCCCT	120
CCCCATGCC ATCCTGCGTC TGGACCTGGC TGGCCGGGAC CTGACTGACT ACCTCATGAA	180
GATCCTCACC GAGCGCGGCT ACAGCTTCAC CAOCACGGCC GAGCGGGAAA TCGTGCGTGA	240
CATTAAGGAG AAGCTGTGCT ACGTCGCCCT GGACTTCGAG CAAGAGATGG CCACGGCTGC	300
TTCCAGCTCC TCCCTGGAGA AGAGCTACGA GCTGCCTGAC GGCCAGGTCA TCACCATGCG	360
CAATGAGCGG TTCCGCTGCC CTGAGGCACT CTTCCAGCCT TCCTTCCTGG GTGAGTGGAG	420
ACTGTCTCCC GGCTCTGCCT GACATGAGGG TTACCCCTCG GGGCTGTGCT GTGGAAGCTA	480
AGTCCTGCCC TCATT	495

配列番号 5

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

CATGTACGTT GCTATCCAGG CT	22
--------------------------	----

配列番号 6

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

AATGAGGGCA GGACTTAGCT TC

22

## 請求の範囲

1. 基板上に微小液滴を保持する方法であって、前記微小液滴を前記基板表面に被覆された前記微小液滴と2相に分離する液体層中で前記基板表面に接触させて保持することを特徴とする微小液滴の保持方法。
2. 前記微小液滴は水性であり、前記基板表面に被覆された液体層は油性であることを特徴とする請求項1記載の微小液滴の保持方法。
3. 前記微小液滴を、前記基板表面に被覆された液体層の表面から打ち込むことを特徴とする請求項1又は2記載の微小液滴の保持方法。
4. 前記基板表面は撥水性を有することを特徴とする請求項1、2又は3記載の微小液滴の保持方法。
5. 前記液体層表面をカバーで覆うことを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の微小液滴の保持方法。
6. 前記微小液滴の近くの前記液体層中に他の水性液体を保持することを特徴とする請求項5記載の微小液滴の保持方法。
7. 前記微小液滴は前記カバーにも接触していることを特徴とする請求項5又は6記載の微小液滴の保持方法。
8. 微小液滴を基板表面に被覆された前記微小液滴と2相に分離する液体層中で前記基板表面に接触させて保持するとともに前記液体層表面をカバーで覆い、前記微小液滴中で反応を行わせることを特徴とする反応方法。
9. 前記微小液滴はDNAを含む水性液滴であり、前記基板表面に被覆された液体層は油性であることを特徴とする請求項8記載の反応方法。
10. 前記微小液滴の接触部位は酵素吸着防止剤を有することを特徴とする請求項9記載の微小液滴の反応方法。
11. 前記微小液滴の接触部位はウシ血清アルブミンコート有することを特徴とする請求項9記載の微小液滴の反応方法。
12. 前記基板表面に被覆された液体層は、厚さが100  $\mu$ m以下であることを特徴とする請求項8又は9記載の反応方法。
13. 透明な下板と、厚さ0.05 mm以下のスペーサと、透明な上板とからなり、スペーサで囲まれた領域に溶液を収容することを特徴とする反応容器。



- 1 4. 前記スペーサは両面接着テープからなることを特徴とする請求項 1 3 記載の反応容器。
- 1 5. 溶液との接触部位はウシ血清アルブミンコートを有することを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載の反応容器。

図 1

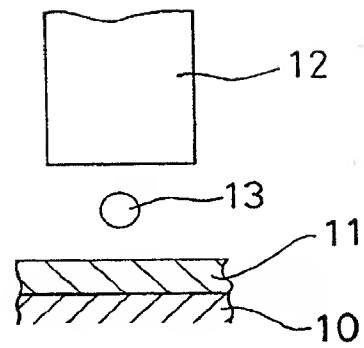


図 2

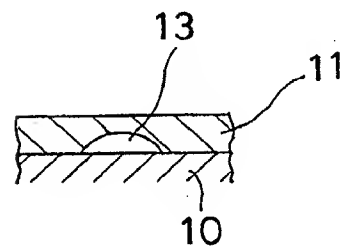


図 3

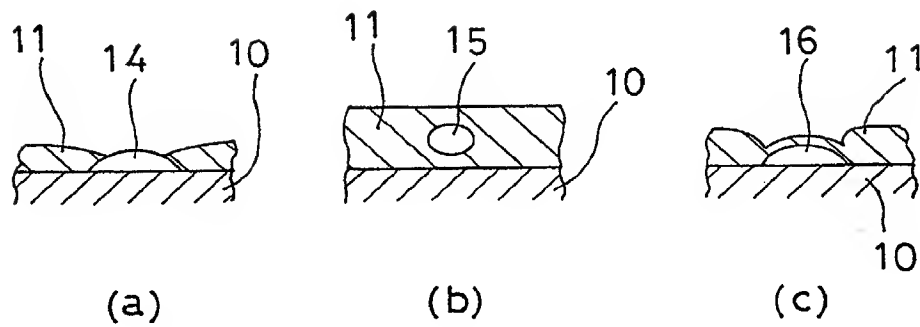


図 4

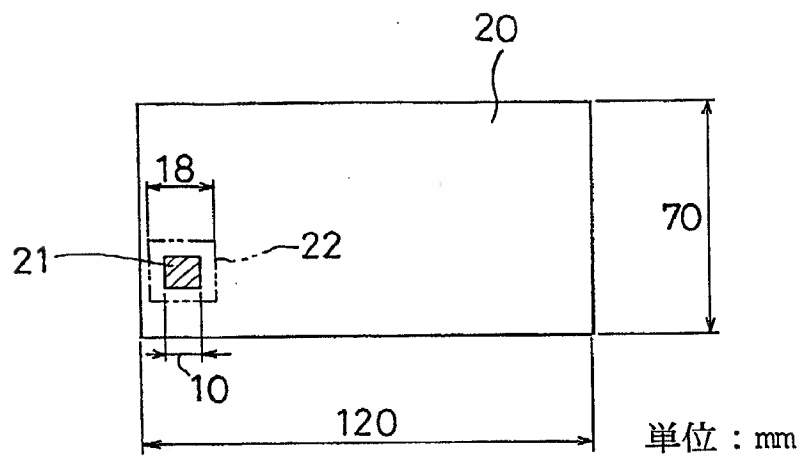


図 5

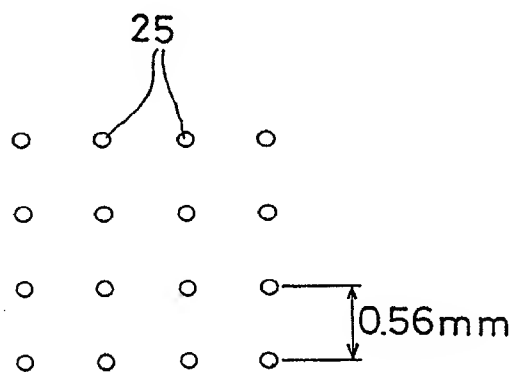


図 6

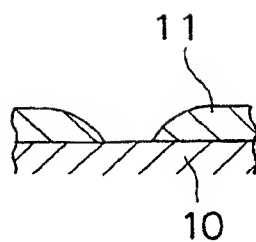


図 7

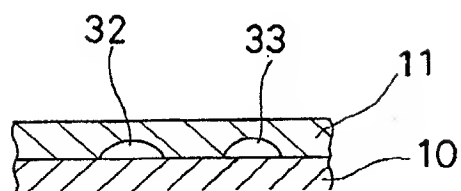


図 8

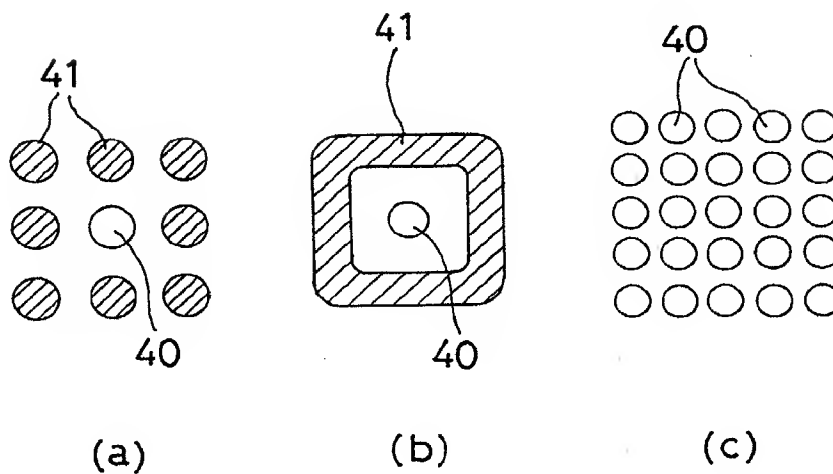


図 9

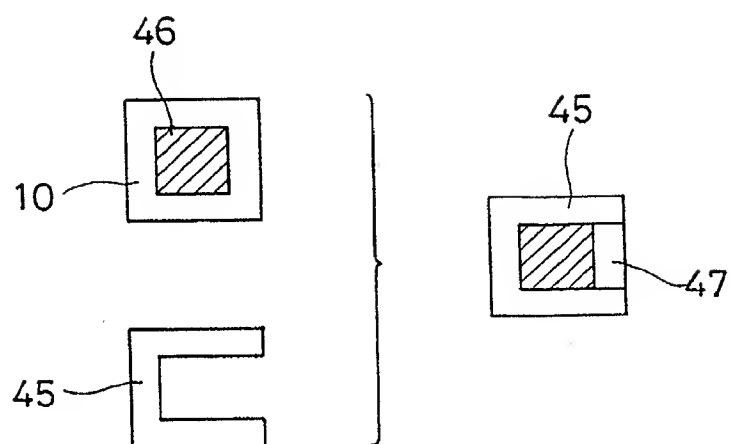


図 10



図 1 1

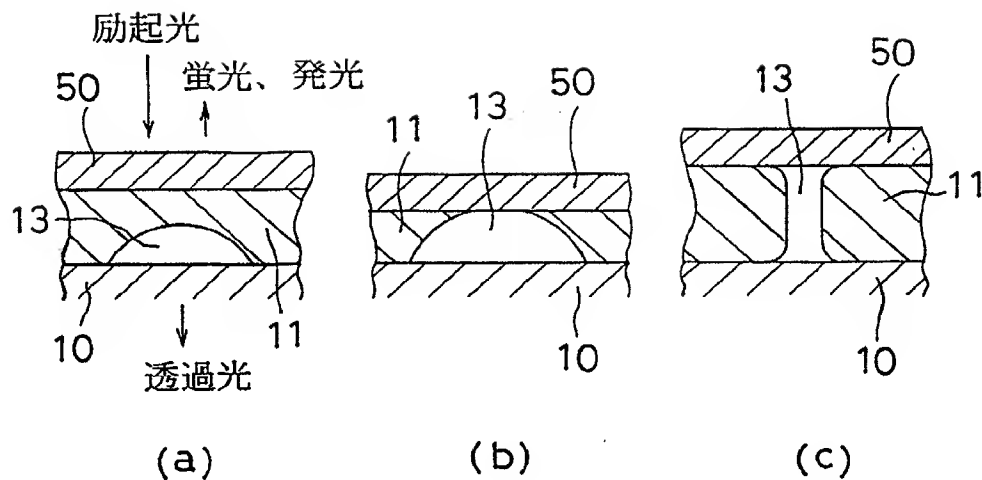


図 1 2

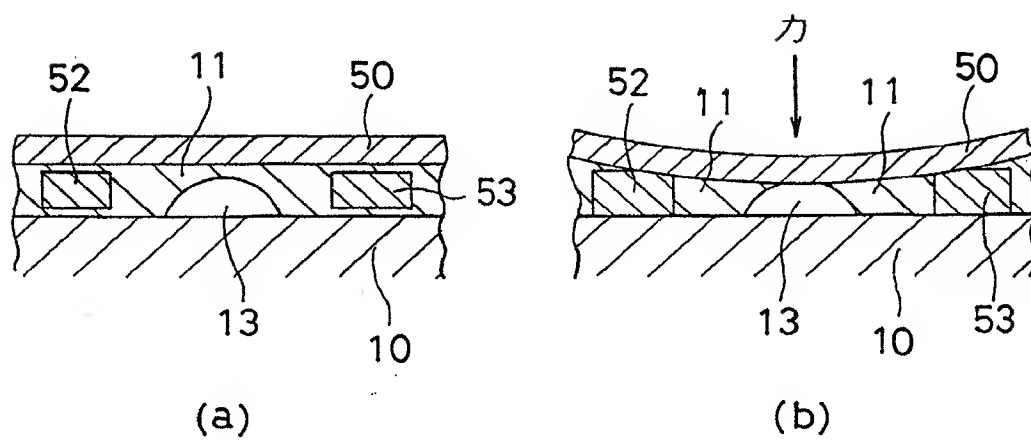


図 1 3

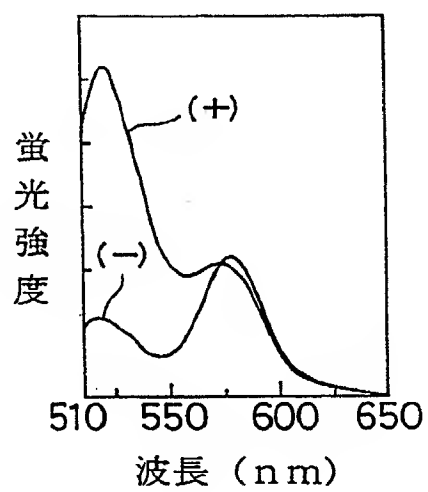




図 14

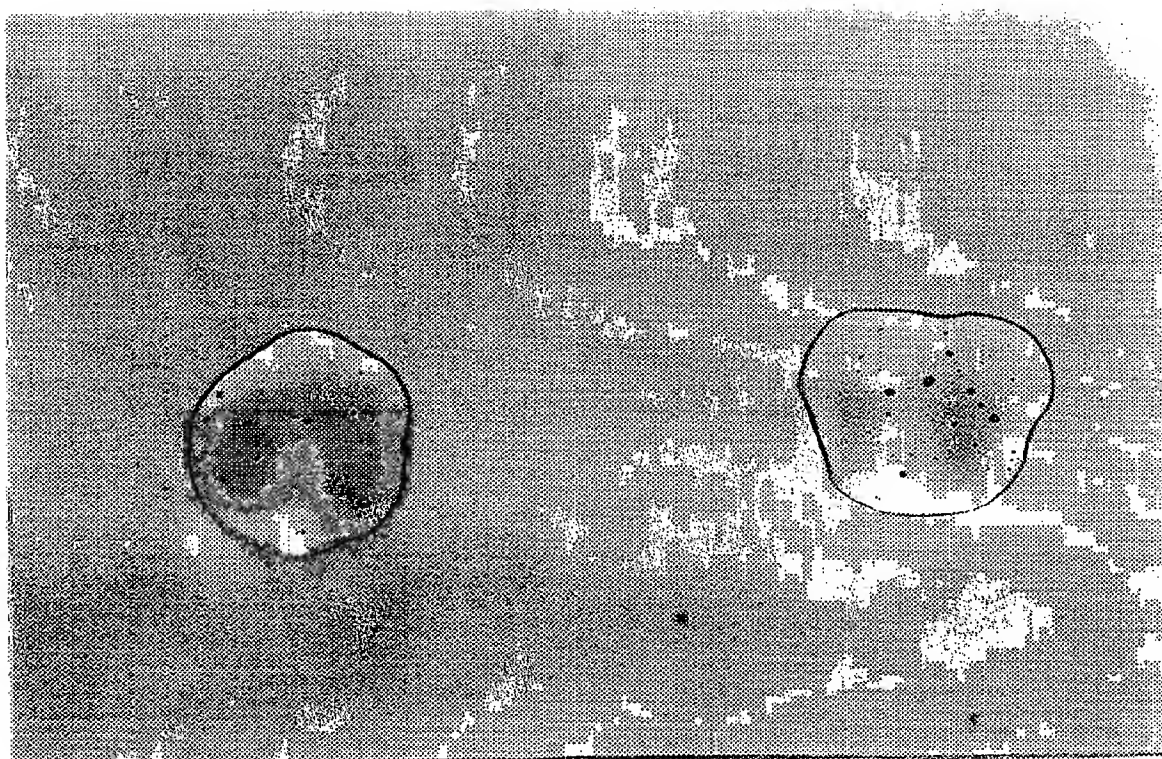


図 15



図 16

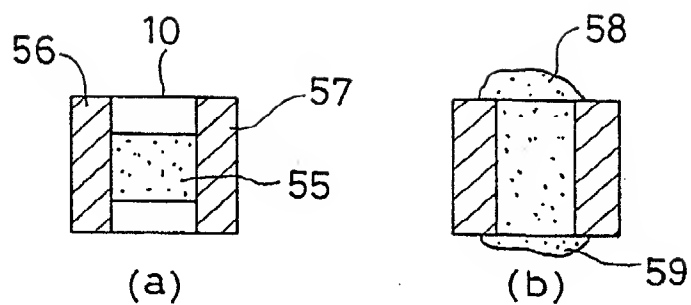


図 17

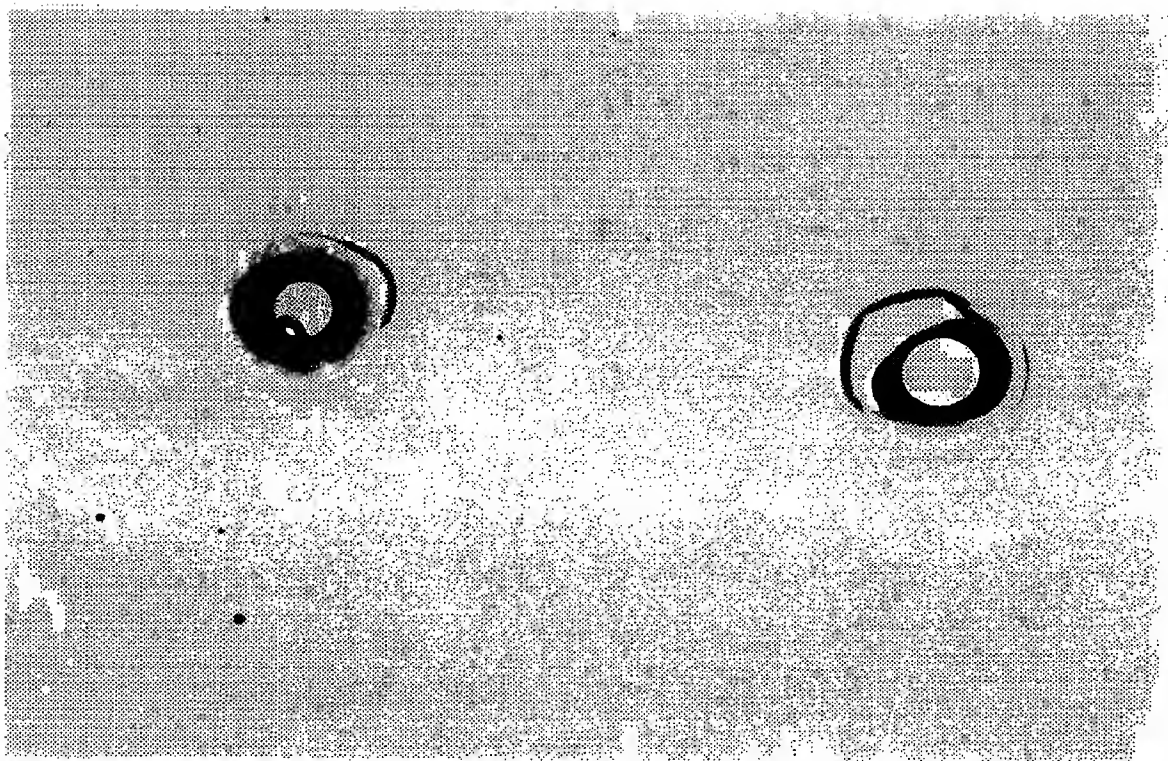


図 18



図 19

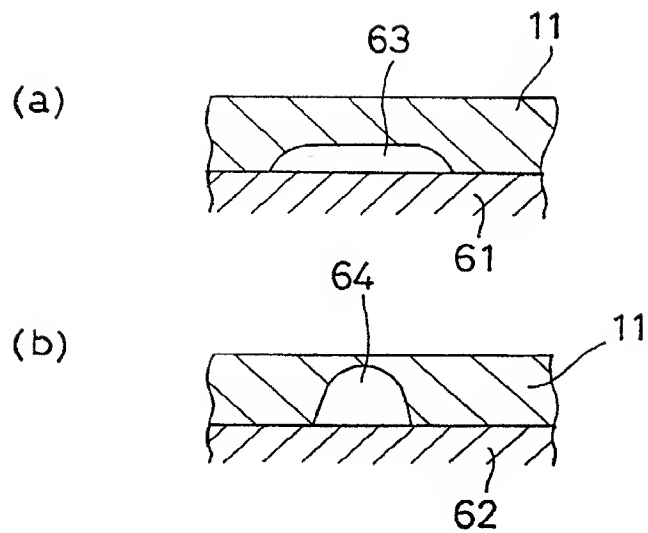


図 20

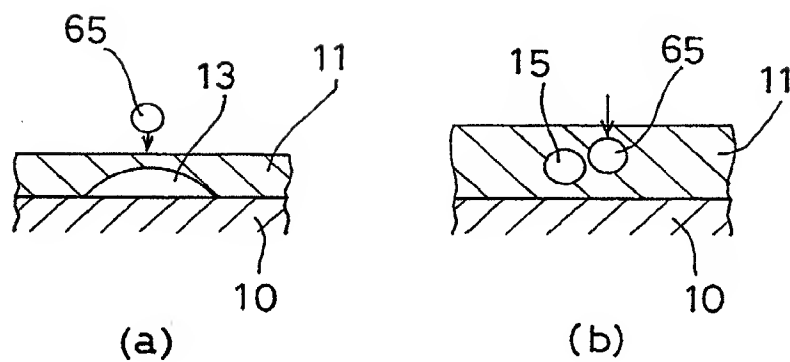


図 2 1

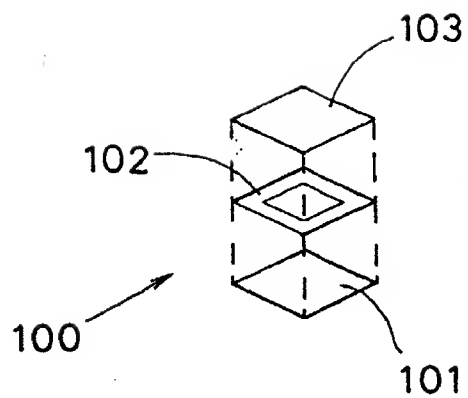


図 2 2

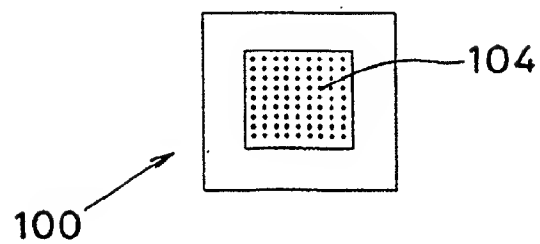


図 2 3

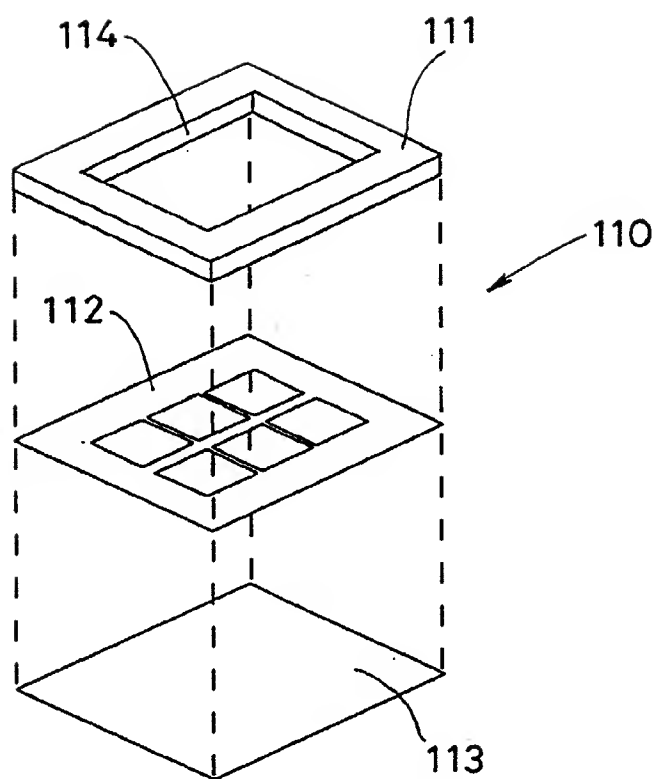


図 2 4

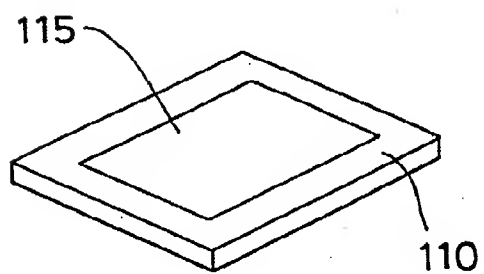




図 25

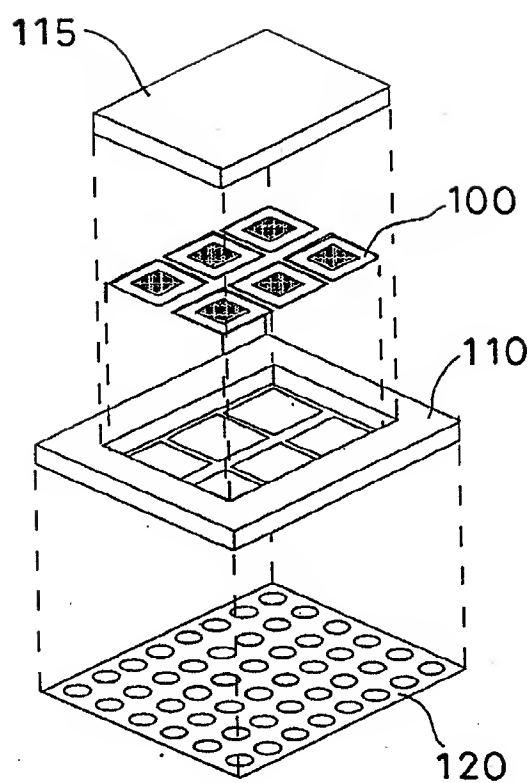


図 2 6

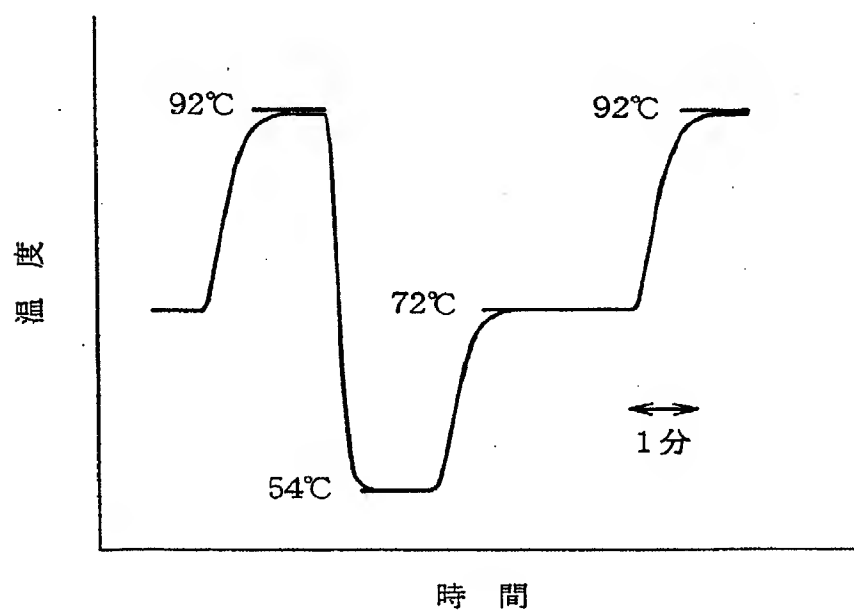


図 2 7

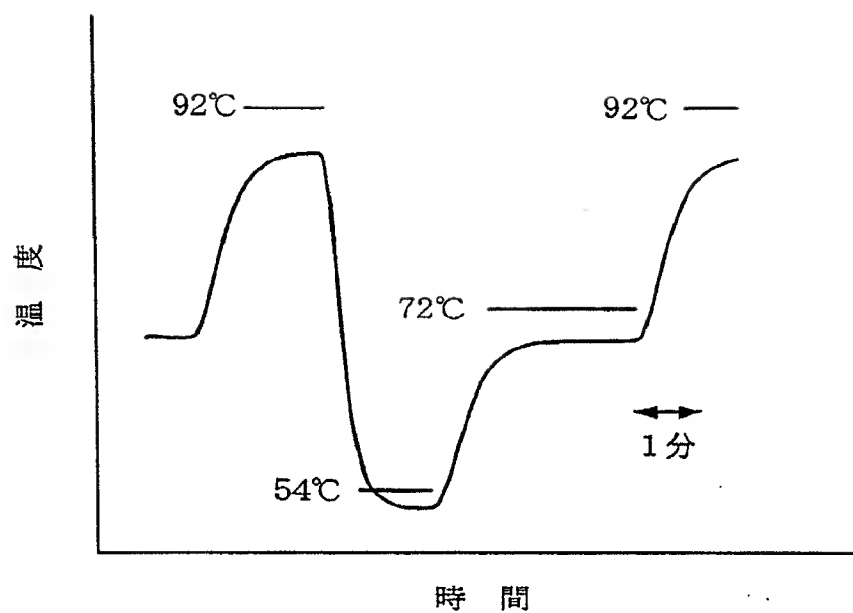


図 2 8

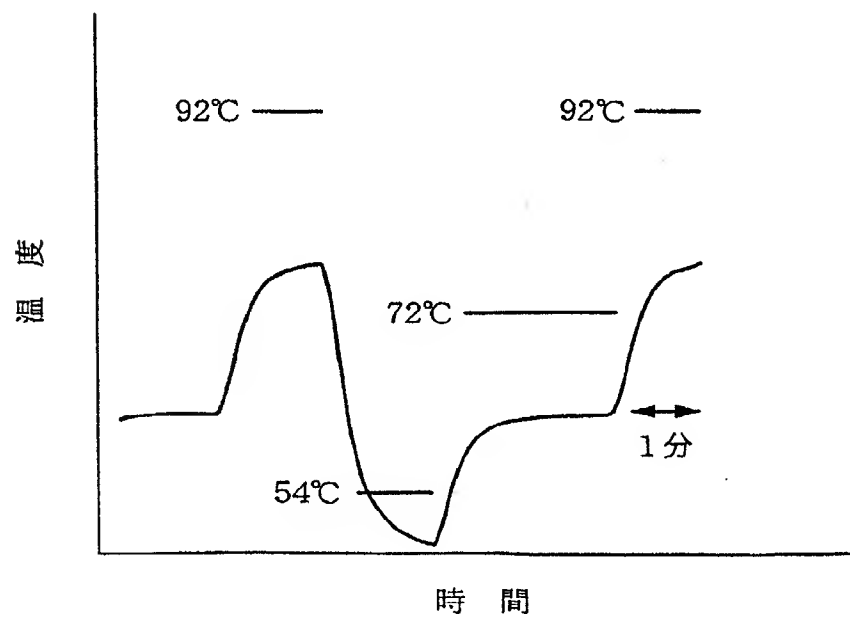


図 2 9

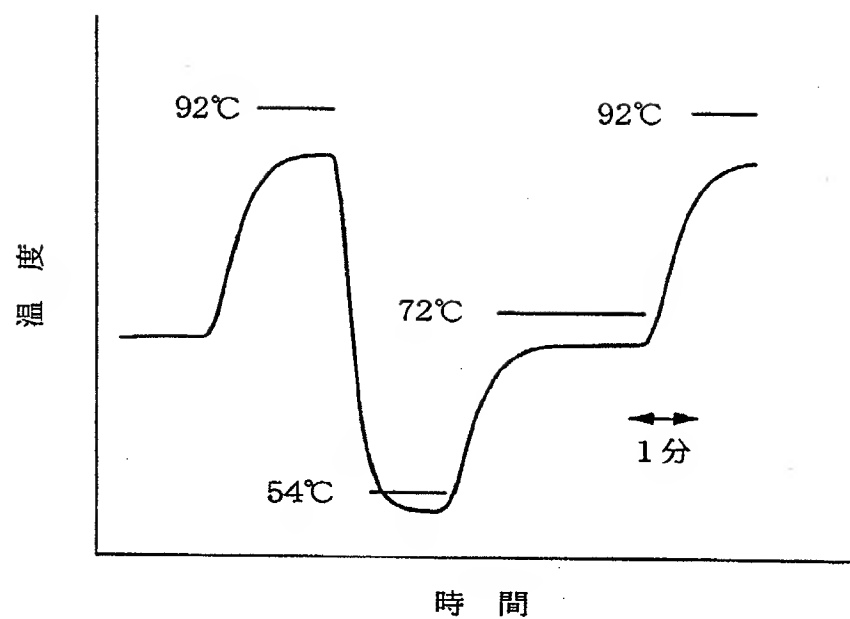


図 3 0

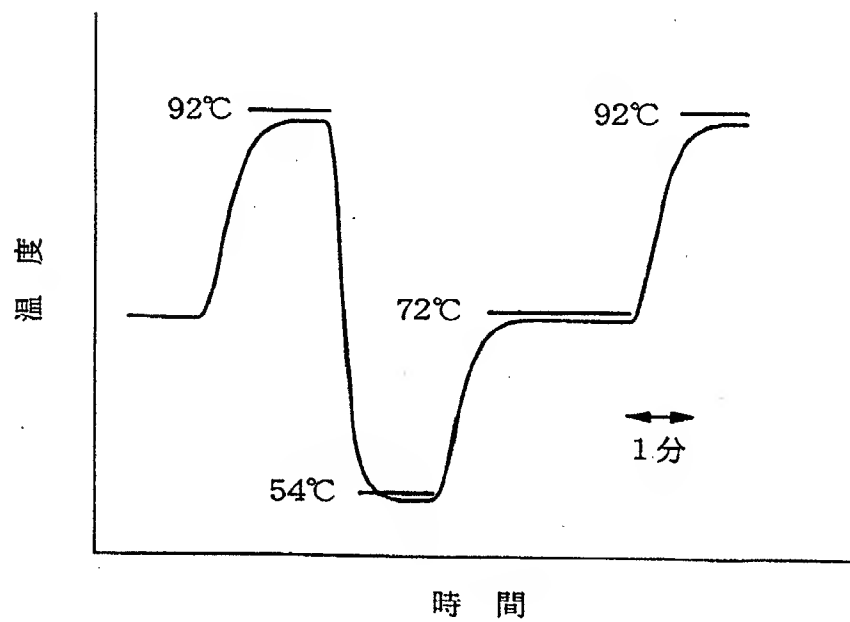


図 3 1

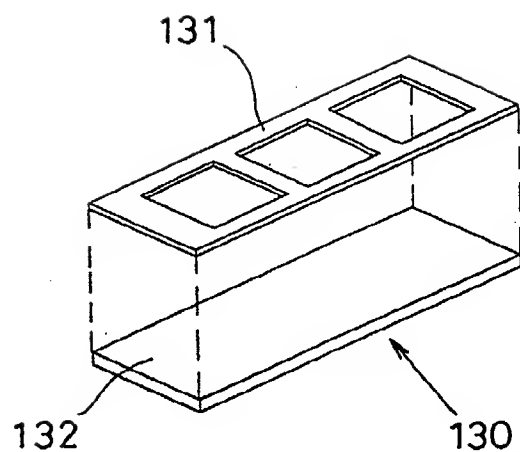


図 3 2

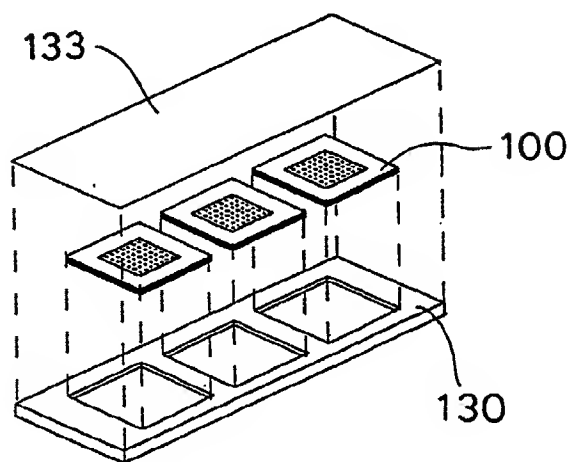


図 3 3

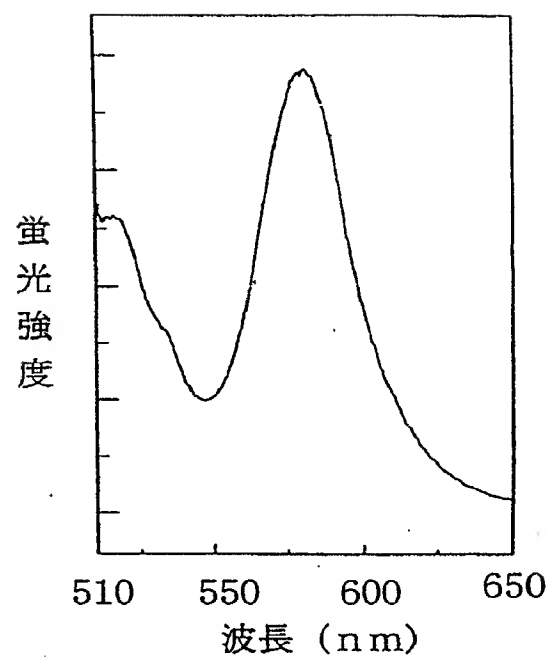


図 3 4

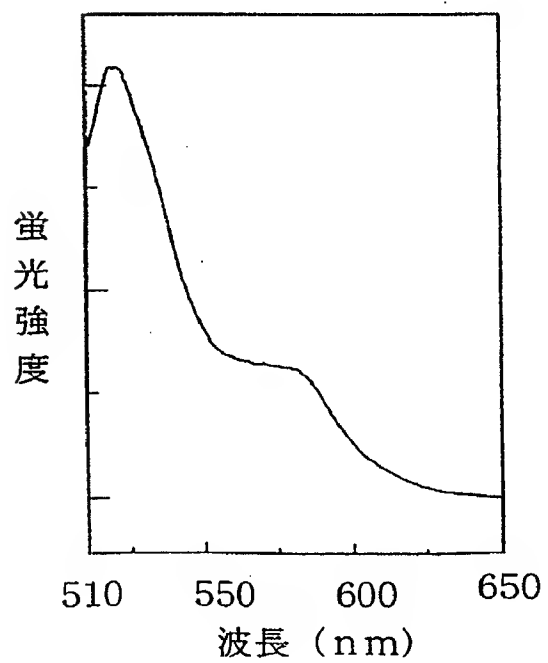


図 3 5

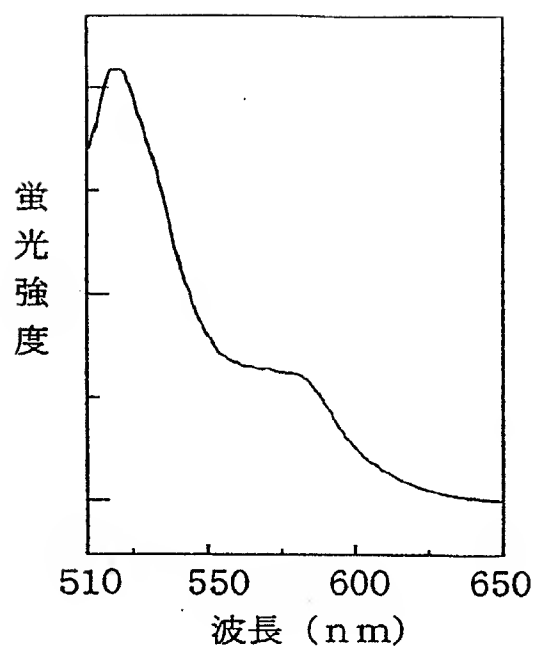


図 3 6

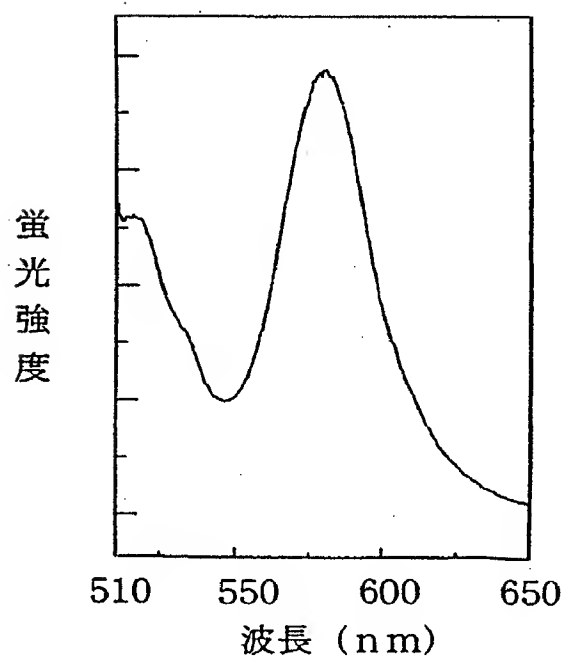


図 3 7

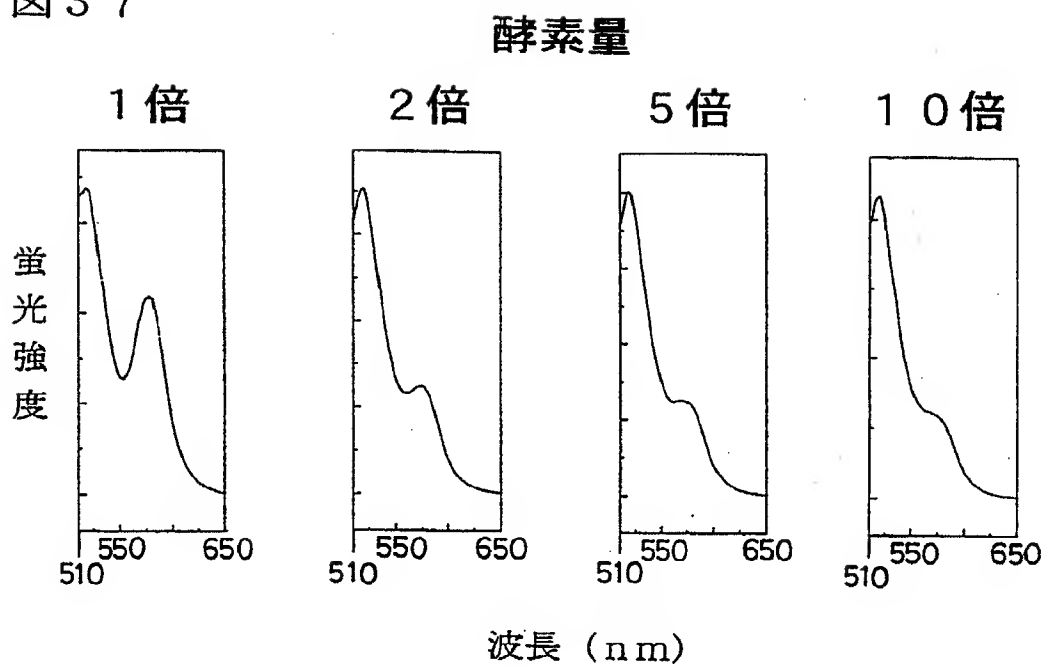


図 3 8

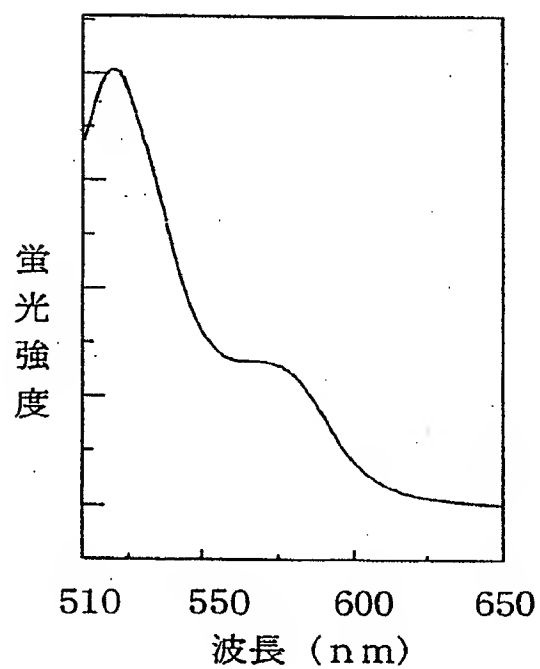




図 3 9

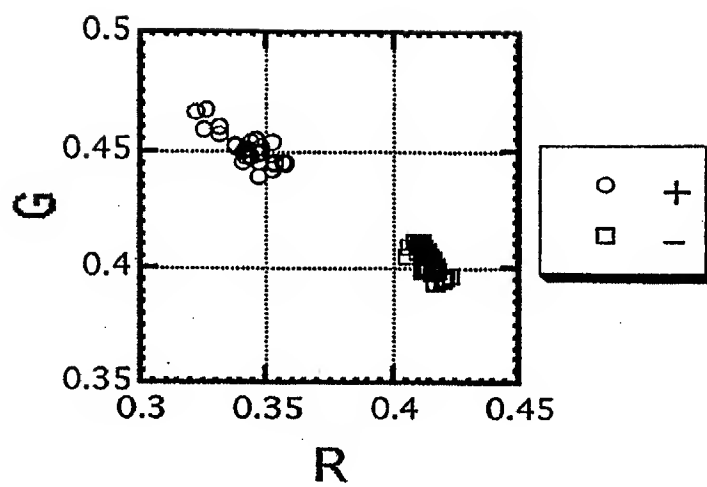


図 4 0



図 4 1

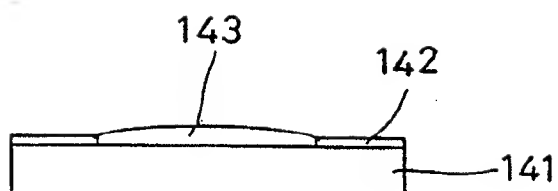
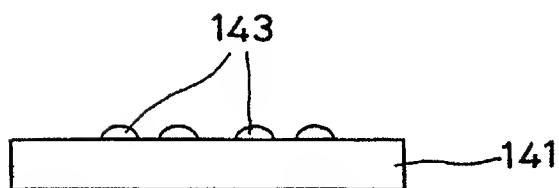


図 4 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02389

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> G01N1/00, C12Q1/68, G01N33/48, C12M1/00, B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> G01N1/00, C12Q1/68, G01N33/48, C12M1/00, B01J19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1940-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1998 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1998

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 4-208836, A (Olympus Optical Co., Ltd.), July 30, 1992 (30. 07. 92), Full text ; Figs. 1 to 9	13 14-15
Y	JP, 6-3231, A (Toppan Printing Co., Ltd.), January 11, 1994 (11. 01. 94), Par. Nos. [0012], [0015], [0019]	13
Y	Par. Nos. [0002], [0004]	14
Y	JP, 9-105708, A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), April 22, 1997 (22. 04. 97), Par. Nos. [0014] to [0025]	13
A	JP, 8-233710, A (Hitachi, Ltd.), September 13, 1996 (13. 09. 96), Par. Nos. [0014] to [0026] ; Figs. 1 to 7	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
August 7, 1998 (07. 08. 98)Date of mailing of the international search report  
August 18, 1998 (18. 08. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>°</sup> G01N1/00, C12Q1/68, G01N33/48, C12M1/00, B01J19/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>°</sup> G01N1/00, C12Q1/68, G01N33/48, C12M1/00, B01J19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-1998年  
 日本国登録実用新案公報 1994-1998年  
 日本国実用新案登録公報 1996-1998年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 4-208836, A (オリンパス光学工業株式会社) 30. 7月. 1992 (30. 07. 92) 全文, 第1-9図	13 14-15
Y	J P, 6-3231, A (凸版印刷株式会社) 11. 1月. 1994 (11. 01. 94)	13
Y	段落番号【0012】, 【0015】, 【0019】 段落番号【0002】, 【0004】	14
Y	J P, 9-105708, A (株式会社京都第一化学) 22. 4月. 1997 (22. 04. 97) 段落番号【0014】-【0025】	13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 08. 98

国際調査報告の発送日

18.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小山 茂 印

2J 7519

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-233710, A (株式会社日立製作所) 13. 9月. 1996 (13. 09. 96) 段落番号【0014】 - 【0026】 及び第1-7図	1-15